

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II**



**ADHERENCIA DE “STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE”
A POLIESTIRENO, PATOGENICIDAD E
INTERFERENCIA DE ANTIBIÓTICOS E IBUPROFENO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Gema del Prado Marugán

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-2418-2**

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología II**



**ADHERENCIA DE
Streptococcus pneumoniae
A POLIESTIRENO, PATOGENICIDAD
E INTERFERENCIA DE
ANTIBIÓTICOS E IBUPROFENO**

**Tesis Doctoral
Gema del Prado Marugán**

Madrid, 2008

I. INTRODUCCIÓN.	9
1. Definición de otitis media y criterios de clasificación.	11
1.1. Otitis media aguda (OMA).	11
1.2. Otitis media con derrame (OMD).	12
1.3. Otitis media crónica (OMC).	13
2. Etiología de la OMA.	14
2.1. Bacterias.	14
2.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	14
2.1.2. Otras bacterias causantes de OMA.	16
2.2. Virus.	16
3. Patogenia de la otitis media neumocócica.	17
3.1. Determinantes de virulencia de <i>S. pneumoniae</i> .	17
3.1.1. Cápsula.	17
3.1.2. Componentes de la pared celular.	18
3.1.3. Proteínas de superficie:	21
3.1.3.1. Proteínas de unión a colina (CBPs).	21
3.1.3.1.1. Antígeno protector: PspA.	21
3.1.3.1.2. Autolisinas: LytA y LytC. Hidrolasa de pared LytB.	22
3.1.3.1.3. Adhesinas: Proteína de superficie C.	22
3.1.4. Otras proteínas y estructuras implicadas en virulencia neumocócica.	23
3.1.4.1. Hemolisinas.	23
3.1.4.2. Neuraminidasa.	24
3.1.4.3. IgA proteasa.	24
3.1.4.4. Pili.	25
3.2. Mecanismos de defensa del hospedador.	26
3.2.1. Mecanismos de defensa inespecíficos.	26
3.2.1.1. Barreras anatómicas.	26
3.2.1.2. Péptidos antimicrobianos inespecíficos.	27
3.2.1.3. Actividad mucociliar.	28
3.2.1.4. Líquido de revestimiento.	29
3.2.1.5. Macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN)	29
3.2.2. Mecanismos de defensa específicos. Respuesta inmune.	30

3.3. Colonización e invasión microbiana.	30
3.4. Reacción del hospedador.	32
4. Diagnóstico de la OMA:	33
4.1. Clínico.	33
4.2. Otoscópico.	34
4.3. Microbiológico.	35
4.4. Otros.	35
5. Complicaciones derivadas de la OMA.	36
6. Epidemiología.	37
6.1. Incidencia.	37
6.2. Patrón temporal.	37
6.3. Reservorio.	37
6.4. Transmisión.	38
6.5. Factores de riesgo.	38
6.5.1. Factores dependientes del hospedador.	38
6.5.2. Factores ambientales.	39
7. Tratamiento de la OMA.	40
7.1. Criterios de aplicación del tratamiento.	40
7.2. Tratamiento con antimicrobianos.	41
7.2.1. Conceptos de farmacocinética y farmacodinamia.	42
7.2.2. Parámetros farmacocinéticos.	43
7.2.3. Índices farmacodinámicos.	46
7.2.4. Correlación entre susceptibilidad <i>in vitro</i> y eficacia terapéutica.	47
7.2.5. Antibióticos empleados en la OMA.	47
7.2.6. Resistencia a antibióticos.	51
7.3. Analgésicos y anti-inflamatorios.	52
7.4. Otros productos.	54
7.5. Cirugía.	55

8. Prevención de la OMA.	56
8.1. Vacunación.	56
8.2. Quimioprofilaxis.	59
8.3. Otros.	60
9. Modelos experimentales para el estudio de la OMA.	60
9.1. El gerbo.	62
 II. OBJETIVOS	 63
 III. MATERIAL Y MÉTODOS	 67
1. Microorganismos.	69
2. Animales.	69
3. Fármacos.	70
3.1. Utilización <i>in vitro</i> .	70
3.2. Utilización <i>in vivo</i> .	70
4. Estudios <i>in vitro</i> .	71
4.1. Estudios de sensibilidad.	71
4.1.1. Determinación de la CMI.	71
4.1.2. Estudios de sinergismo antimicrobiano frente a la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	72
4.1.3. Curvas de mortalidad de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	73
4.1.3.1. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina y eritromicina en diferentes condiciones experimentales.	73

4.1.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina y eritromicina en presencia de ibuprofeno.	74
4.2. Capacidad de adherencia y formación de biopelículas sobre material abiótico.	74
4.2.1. Capacidad de adherencia.	74
4.2.1.1. Establecimiento experimental de adherencia <i>in vitro</i> .	74
4.2.1.2. Impacto del ibuprofeno en la capacidad adherente de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	75
4.2.1.3. Impacto de la asociación de distintos fármacos sobre la capacidad adherente de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	76
4.2.2. Formación de biopelículas.	76
4.2.2.1. Establecimiento experimental de la biopelícula.	76
4.2.2.2. Impacto de ibuprofeno sobre la formación de biopelícula de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	77
4.2.2.3. Visualización de la biopelícula formada por la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60 mediante microscopía confocal sin y con 128 µg/mL de ibuprofeno.	78
4.2.3. Análisis estadístico.	78
5. Estudios <i>in vivo</i> .	79
5.1. Modelo experimental de OMA.	79
5.1.1. Marcaje y depilado del sujeto experimental.	79
5.1.2. Preparación del inóculo.	79
5.1.3. Inoculación de la bacteria en el oído medio.	80
5.1.4. Evaluación de los animales y recogida de datos experimentales.	80

5.2. Estudios farmacocinéticos.	82
5.2.1. Determinación de los niveles del antibiótico en suero.	82
5.2.2. Determinación de los niveles del antibiótico en las muestras de exudado del oído medio previa inoculación de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	83
5.3. Tratamiento con antibióticos e ibuprofeno y estudios de eficacia para la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	84
5.4. Análisis estadístico.	85
5.4.1. Análisis de variables cualitativas.	85
5.4.2. Análisis de variables cuantitativas.	85
IV. RESULTADOS.	87
1. Estudios <i>in vitro</i> .	89
1.1. Estudios de sensibilidad.	89
1.1.1. Determinación de la CMI.	89
1.1.2. Sinergismo antimicrobiano frente a la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	89
1.1.3. Curvas de mortalidad de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	91
1.1.3.1. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina en diferentes condiciones experimentales.	91
1.1.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de eritromicina en diferentes condiciones experimentales.	96
1.1.3.3. Estudio de la asociación de ibuprofeno con antibióticos.	100
1.2. Capacidad de adherencia y formación de biopelículas sobre material abiótico.	102
1.2.1. Capacidad de adherencia.	102
1.2.1.1. Comparación de la capacidad de adherencia de las dos cepas.	102

1.2.1.2. Impacto del ibuprofeno en la capacidad adherente de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	103
1.2.1.3. Impacto de la asociación de ibuprofeno y antibióticos sobre la capacidad adherente de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	104
1.2.2. Formación de biopelículas.	106
1.2.2.1. Características de la biopelícula.	106
1.2.2.2. Comparación de la biopelícula formada por las dos cepas.	107
1.2.2.3. Impacto de ibuprofeno sobre la formación de biopelícula de la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	110
1.2.2.4. Visualización de la biopelícula formada por la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60 mediante microscopía confocal sin y con 128 µg/mL de ibuprofeno.	111
2. Estudios <i>in vivo</i> .	112
2.1. Modelo experimental de OMA.	112
2.1.1. Modelo experimental de OMA con las dos cepas de <i>S. pneumoniae</i> .	112
2.1.2. Evolución de una OMA experimental inducida por la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	113
2.2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos.	115
2.2.1. Estudios con amoxicilina.	115
2.2.1.1. Parámetros farmacocinéticos del antibiótico en suero.	115
2.2.1.2. Parámetros farmacocinéticos e índices farmacodinámicos del antibiótico en las muestras de exudado del oído medio en animales inoculados con la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	115
2.2.2. Estudios con eritromicina.	116
2.2.2.1. Parámetros farmacocinéticos del antibiótico en suero.	116

2.2.2.2. Parámetros farmacocinéticos e índices farmacodinámicos del antibiótico en las muestras de exudado del oído medio en animales inoculados con la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	116
2.3. Tratamiento con antibióticos e ibuprofeno y estudios de eficacia para la cepa <i>S. pneumoniae</i> FJD 60.	119
2.3.1. Valoración de la eficacia de amoxicilina sola o asociada a ibuprofeno	119
2.3.1.1. Eficacia de un tratamiento precoz con una dosis única.	119
2.3.1.2. Eficacia de un tratamiento tardío con dosis múltiples.	122
2.3.2. Valoración de la eficacia de eritromicina sola o asociada a ibuprofeno.	125
2.3.2.1. Eficacia de un tratamiento precoz con una dosis única.	125
2.3.2.2. Eficacia de un tratamiento tardío con dosis múltiples.	129
V. DISCUSIÓN	133
VI. CONCLUSIONES	147
VII. BIBLIOGRAFÍA	151
VIII. APÉNDICE	171

I. INTRODUCCIÓN.

1. DEFINICIÓN DE OTITIS MEDIA Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN.

Se define la otitis media (OM) como una inflamación del oído medio asociada o no a la presencia de líquido en dicho compartimento, que puede dar lugar a una otorrea cuando se produce la perforación de la membrana timpánica (Berman S 1997). Las causas de la afección son diversas e incluyen agentes físicos y químicos, aunque por lo general, su origen es infeccioso, viral o bacteriano. Aunque las OM bacterianas son más frecuentes, a menudo se acompañan de una infección viral (Pichichero ME and Casey Jr 2002).

La clasificación de la OM, se efectúa atendiendo a los síntomas y signos clínicos, los hallazgos otoscópicos, la duración de la enfermedad, la frecuencia de los episodios y el desarrollo de complicaciones. En función de estos criterios, se clasifica la OM en tres tipos fundamentales (Berman S 1997).

1.1. Otitis media aguda (OMA).

La OMA se define como una inflamación aguda del oído medio que viene acompañada de unos síntomas como otalgia, hipoacusia con o sin otorrea y unos signos agudos como fiebre, vómitos o diarrea. El examen otoscópico puede mostrar signos locales de derrame, con abombamiento o disminución de la movilidad de la membrana timpánica (Municio JA y Valencia JC 2003).

Dentro de la OMA se consideran los siguientes grupos (Berman S 1997):

- OMA persistente: Presentación de nuevos síntomas en los 7 días siguientes a la finalización del tratamiento de un episodio agudo (Municio JA y Valencia JC 2003).
- OMA recurrente: Presentación de nuevos síntomas después de 7 días tras la finalización del tratamiento.
- OMA de repetición: El paciente desarrolla 3 nuevos episodios de OMA en un período de 6 meses o bien 4 nuevos episodios a lo largo de un año.

- OMA con complicaciones: Se diagnostica cuando durante una OMA se producen daños en las estructuras del oído medio. Los daños engloban timpanoesclerosis, retracción de la membrana, erosión de los osículos, colesteatoma y perforación con pérdida más o menos acusada de audición.

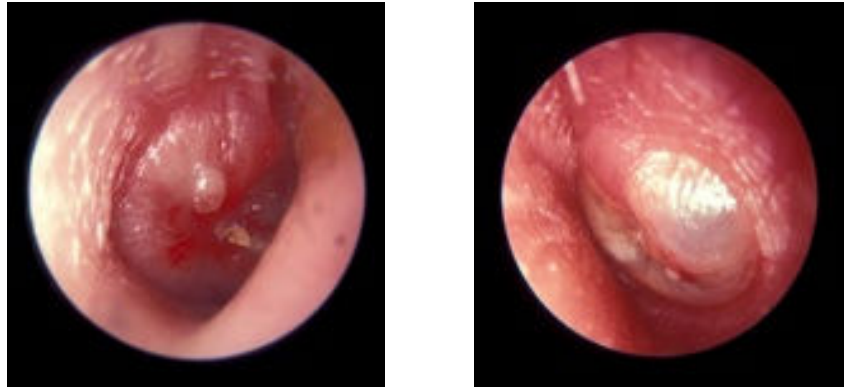


Figura 1. La fotografía A muestra una OMA previa a una perforación. La fotografía B muestra una OMA ya en fase de supuración. Ambas imágenes han sido extraídas de la página <http://otitismedias.hawkelibrary.com/>.

1.2. Otitis media con derrame (OMD).

La OMD, OM secretora, serosa o con efusión viene definida como la presencia de líquido en el oído medio sin clínica aguda acompañante y puede estar asociada a una sensación de oído ocupado. El examen otoscópico permite visualizar una membrana con la movilidad disminuida, translúcida, con presencia de fluido visible a través de ella. Puede asociarse a la existencia de presión negativa dentro del oído medio. La emanación de fluido se debe a: 1) que la infección produce una inflamación de la mucosa que origina una disfunción en los transportadores de sodio del oído medio (Tran Ba Huy P *et al* 2007) y/o 2) un mal funcionamiento de la Trompa de Eustaquio (Municio JA y Valencia JC 2003).

El derrame suele ser seroso o mucoso, y en casos extremos, purulento.

En función de la prolongación de la OMD en el tiempo se establecen los siguientes grupos (Berman S 1997).

- OMD residual: Presenta una efusión asintomática sin signos otoscópicos de inflamación que se prolonga de 3 a 16 semanas después del diagnóstico de la OMA.
- OMD persistente: Se diagnostica cuando hay presencia de la efusión más allá de las 16 semanas tras el diagnóstico.



Figura 2. Imagen otoscópica de una OMD. Extraída de www.tu-audicion.com/.../images

1.2. Otitis media crónica (OMC).

Se considera que se establece una OMC supurativa cuando la otorrea persiste durante más de 6 semanas.



Figura 3. Imagen otoscópica de una OMC con una placa de miringoesclerosis. Extraída de www.fisterra.com/guias2/omc.asp.

En el presente trabajo, nos ocuparemos fundamentalmente de la OMA bacteriana y más concretamente, de la provocada por *Streptococcus pneumoniae*.

2. ETIOLOGÍA DE LA OMA.

2.1. Bacterias.

Son tres las principales especies bacterianas implicadas en la OMA: *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y con menor frecuencia, *Moraxella catarrhalis*. Entre las 3 suponen más del 80% de los casos registrados de OMA. (Soriano F 1997).

2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*.

S. pneumoniae o neumococo es la principal causa de neumonía, meningitis, sinusitis y OMA (Musher DM 2000). Se aísla entre el 25-30% de las muestras de fluido del oído medio en niños afectados (American Academy of Pediatrics and American Academy of Family Physicians, AAP & AAFP 2004). La bacteria pertenece al género *Streptococcus* y al grupo *mitis* (Kawamura Y *et al* 1995, Ruoff KL *et al* 2003), es un coco ovalado, gram positivo aerobio y anaerobio facultativo y generalmente capsulado, que suele disponerse en parejas formando diplococos (Musher DM 2000, Tonnaer EL *et al* 2006) y en medio líquido forma cadenas cortas. No forma esporas y tampoco es móvil. Su identificación en el laboratorio se realiza principalmente atendiendo a cuatro reacciones (Musher DM 2000):

- α -hemólisis en agar sangre cuando se cultiva sobre este medio en aerobiosis a 37 °C. El neumococo produce una neumolisina (α -hemolisina) que degrada la hemoglobina parcialmente en un pigmento verde, de tal forma que las colonias de neumococo aparecen en el agar rodeadas de un halo verdoso. La reacción puede verse favorecida cuando se enriquece la atmósfera con CO₂.
- Negatividad para la prueba de la catalasa.
- Solubilidad en sales biliares debida a la lisis del microorganismo.
- Susceptibilidad a la optoquina o clorhidrato de etil-hidrocupreína, que inhibe el crecimiento del neumococo.

La reciente aparición de neumococos resistentes a optoquina (Muñoz R *et al* 1999, Pikis *et al* 2001) ha propiciado el empleo de la reacción de solubilidad en sales biliares para establecer una identificación definitiva. También se ha comercializado una técnica que realiza la identificación mediante la detección de secuencias únicas de RNA de *S.pneumoniae*. Las técnicas de PCR son más eficaces que el cultivo convencional para detectar neumococos en casos de OMD con un 13% de positivos frente al 5% detectado con el cultivo (Tonnaer EL *et al* 2005).

S .pneumoniae tiene una cápsula polisacáridica, una pared celular compuesta de polisacáridos, proteínas y grandes cantidades de ácidos teicoicos y una membrana plasmática con una bicapa lipídica con numerosas proteínas. En función de las diferencias estructurales de los polisacáridos de la cápsula se puede establecer una clasificación de los neumococos en serotipos (Tonnaer EL *et al* 2006). La técnica clásica para el serotipaje es la reacción de *quellung* (Austrian R *et al* 1976), pero su dificultad y la evidencia de reacciones cruzadas entre los serotipos, han llevado al uso de técnicas alternativas como los kit de aglutinación con partículas de látex (Shutt CK *et al* 2004, García-Suaréz M *et al* 2006), el ensayo *dot blot* (Fenoll A *et al* 1997). Se han descrito más de 90 serotipos de neumococos (Musher DM 2000, Tonnaer EL *et al* 2006), siendo 19, 23, 6, 14 y 3 los principales serotipos implicados en la OMA (Klein JO 1994, Asociación Española de Pediatría 2002, Casey JR and Pichicehro 2004).



Figura 4. *S. pneumoniae* Extraída de www.hipernatural.com/es/enfneumococo.

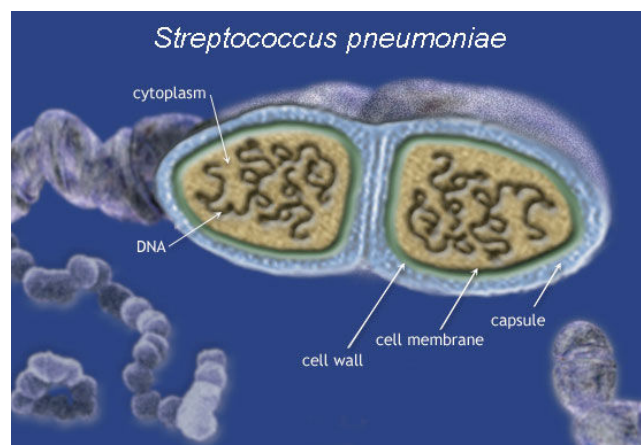


Figura 5. Modelo de la estructura de *S. pneumoniae*. Imagen extraída de www.chori.org/.../test_research.

2.1.2. Otras bacterias causantes de OMA.

H. influenzae ha sido aislado entre el 15-30 % de las muestras de fluido del oído medio en niños con OMA (AAP & AAFP 2004). De los aislados obtenidos, tan solo el 10 % pertenecen al serotipo b y el resto se corresponden con cepas no tipables (Klein JO 1994, Gene A *et al* 2004).

M. catarrhalis se aísla entre el 3-20 % de las muestras de fluido del oído medio en casos de niños con OMA (AAP & AAFP 2004). La infección causada por *M. catarrhalis* tiene una mayor tasa de resolución espontánea que en el caso de la causada tanto por *S. pneumoniae* como *H. influenzae*.

El aislamiento de otros microorganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* es más frecuente en OM crónicas (Klein JO 1994, Soriano F 1997).

Existe un 15 - 34 % de cultivos negativos de fluido del oído medio obtenidos de pacientes con OMA que podrían representar bacterias inviables, virus, microorganismos de los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma*, anaerobios o nuevas especies (Soriano F 1997). La patogenicidad de *Chlamydia trachomatis*, que parece asociarse a OMA en niños menores de 6 meses (Klein JO 1994) ya ha sido demostrada en un modelo experimental en chinchillas (Weber PC and Koltai PJ 1991). *Mycoplasma pneumoniae* puede provocar una OMA concomitante en pacientes con infección del tracto respiratorio (Klein JO 1994).

Las infecciones con cultivos mixtos tienen una frecuencia variable y se dan principalmente entre *H. influenzae* y *S. pneumoniae* (Soriano F 1997).

2.2. Virus.

Los virus pueden considerarse en ocasiones agentes etiológicos únicos o coinfectantes con bacterias (Gene A *et al* 2004). Las infecciones víricas de las vías respiratorias a menudo preceden o coinciden con una OMA bacteriana en niños (Kleemola M *et al* 2006) y aunque se aceptan como factor favorecedor de la OMA, el papel de los virus sigue generando controversia, ya que no se ha podido demostrar replicación vírica en el oído medio (del Castillo F *et al* 2007). En una OMA con coinfección virus-

bacteria se ha sugerido que la persistencia de los síntomas tras el tratamiento antimicrobiano podría ser debida a la existencia de interferencias en la respuesta clínica y bacteriológica (Chonmaitre *et al* 1986). Virus Respiratorio Sincitial (RSV), Adenovirus, Virus Influenza, Enterovirus y Rhinovirus han sido identificados y asociados a infección bacteriana en un 20 % de las muestras aisladas de pacientes con OMA. La asociación con metaneumovirus en una OMA, aunque poco frecuente, se debe considerar cuando se han descartado otros virus (Suzuki A *et al* 2005).

3. PATOGENIA DE LA OMA NEUMOCÓCICA.

3.1. Determinantes de virulencia de *S .pneumoniae*.

3.1.1. Cápsula.

La cápsula es el principal factor de virulencia de *S.pneumoniae* (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995, Jedrzejas MJ *et al* 2001, García-Suaréz M *et al* 2006, Tonnaer EL *et al* 2006). Se ha comprobado que las cepas capsuladas son aproximadamente 10^5 veces más virulentas que las no capsuladas. Estudios previos con mutantes han establecido una relación directa entre el tipo de cápsula y la virulencia, si bien se requieren otros componentes para que el neumococo sea completamente virulento (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995).

La cápsula neumocócica está compuesta fundamentalmente por polisacáridos unidos covalentemente a la superficie bacteriana a través del peptidoglicano y el polisacárido C de la pared celular (Musher DM 2000). Puede contener moléculas no sacarídicas como la colina, la cual se ha detectado en 6 tipos capsulares distintos. Su composición química y su estructura explican su implicación en la virulencia:

- 1- La cápsula interfiere en la opsonización y evita la fagocitosis de la bacteria, bien por enmascaramiento de los constituyentes de la pared bacteriana y fijación del factor C3b de la vía alternativa del complemento por debajo de la cápsula (Musher DM 2000) o por degradación del factor C3b hasta C3d. Los serotipos que adoptan esta última estrategia son muy resistentes a la fagocitosis y resultan altamente inmunogénicos (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995).

- 2- La cápsula es una estructura altamente hidratada con un gran número de cargas negativas debido a la abundancia de polisacáridos polianiónicos en su composición (Nelson 2007), aspecto que regula el intercambio de moléculas e iones con la membrana celular y la adherencia de la bacteria, así como la formación de biopelículas y microcolonias (Kamerling JP 2000, Hammerschmidt S *et al* 2005).
- 3- Su estructura modular ayuda al intercambio de genes específicos entre los distintos serotipos, lo cual se considera de gran importancia en fenómenos de comunicación “de célula a célula” (García-Suaréz M *et al* 2006). Este hecho podría explicar como los neumococos pueden alternar su morfología capsular de un fenotipo opaco (potentes inductores de inflamación, altamente virulentos) a otro transparente (gran capacidad de adherencia) dependiendo de su interacción con el hospedador (Tonnaer EL *et al* 2006). El fenómeno de “alternado” se ha observado tanto en cepas capsuladas aisladas de una infección invasiva como en serotipos presentes en la nasofaringe humana (García-Suaréz M *et al* 2006).

3.1.2. Componentes de la pared celular.

La pared celular del neumococo está constituida principalmente por peptidoglicano y ácidos teicoicos (Musher DM 2000).

El peptidoglicano es una molécula compleja compuesta por dos derivados de carbohidratos, N-acetil –D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidos a cadenas de 4 a 6 aminoácidos (péptidos *stem*). Los péptidos *stem* generalmente contienen un tripéptido de L-alanina, D-isoglutamina y L-lisina (López y García *et al* 2004) y se unen a través de puentes de pentaglicina, otorgando consistencia a la estructura (Musher DM 2000). La disposición de capas múltiples de peptidoglicano conforma una estructura rígida que hace susceptible al neumococo a la tinción de Gram, ya que el cristal violeta queda retenido entre estas capas (Nau R y Eiffert H 2002). Aunque se han atribuido al peptidoglicano muchos efectos en su interacción con el organismo hospedador, su papel en la patogénesis no está del todo claro. Se sabe que la pared celular de bacterias Gram positivas induce tanto la liberación de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en cultivos de macrófagos/monocitos, como la unión de CD14, (receptor implicado en la inducción de citoquinas en la infección por Gram positivas), por lo que podría actuar en la inflamación sistémica provocada por bacterias Gram positivas en una acción sinérgica con los ácidos lipoteicoicos (Nau R y Eiffert H 2002).

Los ácidos teicoicos son polímeros carbohidratados que contienen residuos de ribitol o glicerol unidos por enlace fosfodiéster y que contienen un aminoácido común (D-alanina) o azúcares (glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina) como sustituyentes. En el neumococo, los ácidos teicoicos son ricos en galactosamina, fosfato y colina (Nau R y Eiffert H 2002)., también contienen fosforilcolina (Musher DM 2000). La colina es un aminoalcohol esencial por su papel como factor de crecimiento y como ligando de las proteínas de unión a colina o CBPs (Tomasz A 1968). Y la fosforilcolina interactúa con el sistema inmune (Harnett W y Harnett MM 1999). No obstante, la composición de los ácidos teicoicos puede variar en función del medio de crecimiento (Nau R y Eiffert H 2002).

Se diferencian dos tipos de ácidos teicoicos:

- Los ácidos teicoicos de la pared celular (TAs) se unen covalentemente al peptidoglicano y contribuyen a la resistencia de la bacteria al medio, la autólisis y la transformación de DNA (Nau R y Eiffert H 2002). Los TAs se disponen en la mayor parte de la superficie de la pared celular y una pequeña fracción sobresale entrando en la cápsula (Musher DM 2000).
- Los ácidos lipoteicoicos (LTAs) se encuentran unidos covalentemente a la membrana plasmática. La implicación en la patogenia de los LTAs puede variar en función de la especie bacteriana, aunque actúan como elicitores en la respuesta inflamatoria del hospedador (Nau R y Eiffert H 2002). Una estructura importante en el neumococo es el antígeno de Forssman, un LTA similar al polisacárido C muy rico en fosforilcolina, que resulta un potente inhibidor de la autolisina (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995) y potencia la adherencia bacteriana a células de mamíferos (Weiser JN *et al* 1996).

La fracción de ácido teicoico que entra en la cápsula junto con fragmentos muy adheridos de peptidoglicano forman el polisacárido C, polisacárido de la pared celular o PSPC (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995), presente en todos los neumococos y en algunos pertenecientes al grupo *S. viridans*. PSPC es responsable de la reacción entre el neumococo y unas proteínas (proteínas C reactivas de fase aguda) que aumentan en la sangre en ciertas afecciones (Musher DM 2000).

A diferencia del polisacárido capsular, se ha observado que el peptidoglicano purificado y, especialmente PSPC, puede desencadenar un proceso de inflamación similar al inducido por el neumococo completo a través de la vía del complemento (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995).

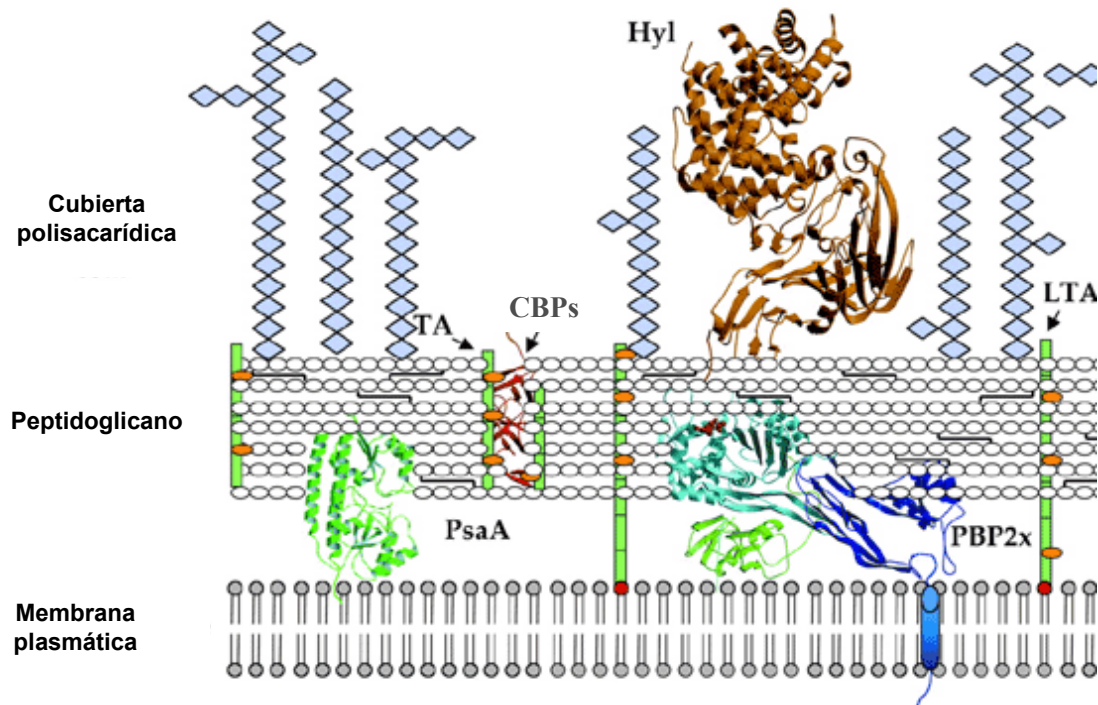


Figura 6. Modelo de la pared celular del neumococo. Los ácidos teicoicos (TAs) y lipoteicoicos (LTAs) se representan en verde y los fosfatos carbohidratados ricos en colina, en naranja. La unión del LTA a la membrana plasmática se representa en color rojo. Las proteínas fijadoras de colina (CBPs) se unen a la pared, al TA o al LTA mediante un dominio representado como una cinta roja. El antígeno de superficie neumocócica (PsaA) aparece representado en verde inmerso en el peptidoglicano. Las proteínas que unen penicilina (PBPs) aparecen en color azul en el espacio periplásmico en contacto con el peptidoglicano. La hialuronato liasa se une al peptidoglicano en la zona más externa y se representa en marrón entre la cubierta polisacáridica (en azul claro). Imagen modificada de la extraída de www.nature.com/.../n8/fig_tab/embor106_f2.html.

3.1.3. Proteínas de superficie.

El neumococo contiene más de 500 proteínas de superficie y aunque varias de ellas se han relacionado con la patogenicidad de la bacteria, solo unas pocas han sido confirmadas como factores de virulencia (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995). Algunas proteínas se asocian fisiológicamente con la membrana y otras con la pared celular, y a menudo están implicadas en la interacción directa con los tejidos del hospedador o en proteger la superficie bacteriana de los mecanismos defensivos del mismo (Jedrezjas MJ 2001).

3.1.3.1. Proteínas de unión a colina (CBPs).

Bajo el nombre CBPs se agrupa una familia de proteínas que incluye factores de virulencia como la proteína de superficie neumocócica (PspA) o antígeno A protector, la N-acetil-muramoil-L-alaninamidasas (LytA), la β -N-acetilglucosamidasas (LytB), la lisozima (LytC) y la proteína de superficie neumocócica C (PspC, SpsA o CbpA, proteína de unión a colina). La estructura básica de las CBPs es modular, generalmente con un péptido líder, un dominio N-terminal biológicamente activo que determina la función y un dominio C-terminal muy conservado de unión a colina (Bergmann S y Hammerschmidt S 2006).

3.1.3.1.1. Antígeno A protector: PspA.

PspA es una proteína localizada en la pared celular del neumococo y que se estructura en cuatro dominios diferenciados: un extremo N-terminal con una región abundante en α -hélice que atraviesa la pared celular y sobresale fuera de la cápsula, un dominio rico en prolina, una región muy conservada de repeticiones de 20 aminoácidos y una cola hidrofóbica en el extremo C-terminal (Jedrezjas MJ 2001).

PspA parece implicada en la protección del neumococo frente al sistema del complemento del hospedador, ya que la alta polaridad de esta proteína podría estabilizar la carga de la cápsula por el extremo electropositivo y evitar la activación del complemento a través de la región electronegativa presente en PspA (Jedrezjas MJ *et al* 2001). Por otro lado, se generan fuerzas electroquímicas de repulsión entre la bacteria y los fagocitos, lo cual explicaría un mecanismo de evasión de la fagocitosis (Musher D 2000).

3.1.3.1.2. Autolisinas: *LytA* y *LytC*. Hidrolasa de pared *LytB*.

Las autolisinas, son proteínas de la superficie celular que pertenecen a un grupo muy extendido de enzimas degradantes. Están implicadas en el crecimiento de la pared celular y en el proceso de separación de los microorganismos durante la reproducción, aunque su principal actuación es en la destrucción de la pared celular (Jedrezjas MJ *et al* 2001).

LytA (*LytA* amidasa) es la autolisina del grupo mejor caracterizada. Se compone de dos dominios estructurales: uno localizado en el extremo N-terminal, que probablemente es el que determina la función amidasa y es responsable de la actividad lítica sobre el peptidoglicano neumocócico y otro dominio en el extremo C-terminal que reacciona con los residuos de colina de TAs o LTAs de la superficie del neumococo (Jedrezjas MJ *et al* 2001), lo que es esencial para que la enzima desarrolle su actividad lítica (Tomasz A *et al* 1970).

LytA induce una elevada respuesta inflamatoria como resultado de la liberación de los componentes de la pared celular. Por otro lado, libera al medio proteínas citoplasmáticas de la bacteria, incluyendo otros factores de virulencia (Jedrezjas MJ *et al* 2001). Se ha observado que *LytA* desempeña un importante papel en la infección del oído medio en chinchillas (Sato K *et al* 1996).

LytC es una autolisina con actividad lisozimática. *LytB* es una glucosaminidasa que actúa en la separación celular del neumococo. En ambas, el dominio de unión a colina se localiza en el extremo N-terminal.

3.1.3.1.3. Adhesinas: *Proteína de superficie C*.

La proteína de superficie C (*PspC*, *SpsA* o *CbpA*, proteína de unión a colina) es la CBP predominante en los aislados del neumococo y la primera adhesina identificada en la superficie de la bacteria. Su estructura consta de un extremo N-terminal funcional, una secuencia de unión de prolina y un C-terminal con una región repetida responsable de la unión a colina.

La PspC es un factor importante tanto para la adherencia del neumococo a los tejidos del hospedador como para la colonización bacteriana. Como adhesina, PspC actúa como puente entre la colina de los TAs y los glicoconjugados de las células humanas (Jedrezjas MJ *et al* 2001) a través del ectodominio del receptor Ig polimérico o componente secretor (Hammerschmidt S *et al* 2000). La unión con las células del hospedador bloquea los residuos de colina de la pared celular evitando el ataque de estos por citoquinas humanas activadas y evadiendo así la fagocitosis (Cundell D *et al* 1995). Otro mecanismo de evasión es el reclutamiento del factor H del complemento que realizan algunas PspC evitando así la activación de 3Cb, responsable de la opsonofagocitosis (Jarva H *et al* 2004).

3.1.4. Otras proteínas y estructuras implicadas en virulencia neumocócica.

3.1.4.1. Hemolisinas.

Las hemolisinas son exotoxinas producidas por los neumococos. Se han descrito dos tipos: la neumolisina (Ply) y otra hemolisina que no se inhibe por anticuerpos anti-neumocócicos específicos y que puede inactivarse por colesterol (Canvin JR *et al* 1997).

Ply es una enzima citoplasmática perteneciente a un grupo de proteínas conocido como citolisinas dependientes de colesterol (CDCs). Se cree que su estructura es similar a las CDCs de otras bacterias, comparándose su estructura con la de la perfringolisina de *Clostridium perfringens*. Según este modelo Ply tendría 4 dominios, siendo el 4,^o el responsable de la unión a colesterol (Jedrezjas MJ *et al* 2001).

La actuación de Ply depende en mayor medida de la autolisina, ya que su liberación se produce tras la lisis neumocócica (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995, Jedrzejas MJ *et al* 2001). La virulencia y las múltiples funciones de Ply resultan cruciales ya que se producen en etapas tempranas de la infección neumocócica (Jedrzejas MJ *et al* 2001). En la respuesta inflamatoria, estimula la producción de TNF- α e IL-1 β (Houldsworth S *et al* 1994). Ply bloquea la respuesta inmune: a bajas concentraciones inhibe el mecanismo de respiración de neutrófilos y monocitos, la quimiotaxis, la actividad bactericida de las células polimorfonucleares (PMN) y la producción de algunas linfoquinas e inmunoglobulinas (Rubins JB and Janoff EN 1998). También puede activar la ruta clásica del complemento uniéndose a la región Fc de la Ig G, generando poros transmembrana

por oligomerización en la superficie de las células que revisten el tracto respiratorio (Nau R y Eiffert H 2002) y disminuyendo el movimiento ciliar (Gilbert RJ *et al* 1999).

3.1.4.2. Neuraminidasa.

La neuraminidasa es una enzima presente en todos los serotipos de neumococo examinados. Se conocen dos formas de la enzima: neuraminidasa A (NanA) y B (NanB). NanA se localiza en la superficie de la bacteria y contiene una secuencia a través de la cual podría unirse al peptidoglicano. Su actividad máxima es a pH 5. NanB es aproximadamente 100 veces más pequeña que NanA y su actividad máxima es en torno a pH 7

No se conoce su estructura tridimensional, por lo que se extrapola el modelo a neuraminidasas de origen viral o a la de *Salmonella* serotipo Typhimurium (Jedrzejewski MJ *et al* 2001).

La neuraminidasa libera el ácido siálico presente en los glicanos de superficie celular del hospedador (mucinas, glicolípidos y glicoproteínas) variando los patrones de glicosilación. La célula del hospedador expone en la superficie receptores que interaccionan con el neumococo, aumentando los fenómenos de adhesión y otros procesos (Krivan HC *et al* 1988). La pérdida del ácido siálico facilitaría la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio (Bergmann S and Hammerschmidt S 2006).

3.1.4.3. IgA proteasa.

La IgA proteasa es una de las cuatro metaloproteasas que puede producir el neumococo junto con ZmpB, ZmpC y ZmpC. Se ancla a la pared celular por el extremo N-terminal. La IgA proteasa es producida por todos los neumococos (Polissi *et al* 1998) e interfiere en los mecanismos defensivos del hospedador en superficies mucosas (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995) al liberar inmunoglobulina A serotipo-específica que se une a las mucosas y al neumococo, aumentando la adherencia de la bacteria a la superficie de la célula del hospedador (Weiser JN *et al* 2003).

3.1.4.4. Pili.

Los pili son organelas alargadas que se extienden a través de la cápsula polisacáridica. Estas estructuras poliméricas se generan en una reacción mediada por una transpeptidasa, donde se produce un entrecruzamiento covalente entre motivos LPXTG. Estos motivos contienen a su vez subunidades proteicas ensambladas por otras proteínas, las sortasas, también responsables de la unión covalente del pili al peptidoglicano.

El papel de estos pili en la patogénesis es dual. Por un lado, la expresión del pili potencia la adherencia inicial de la bacteria y promueve la colonización en la nasofaringe. Al evitar su eliminación temprana de la mucosa, el neumococo supera la barrera mucosa y adquiere la habilidad de causar una enfermedad invasiva. Por otro lado, se produce una respuesta inflamatoria elevada, debido al incremento en la producción de TNF- α (Barocchi MA *et al* 2006).

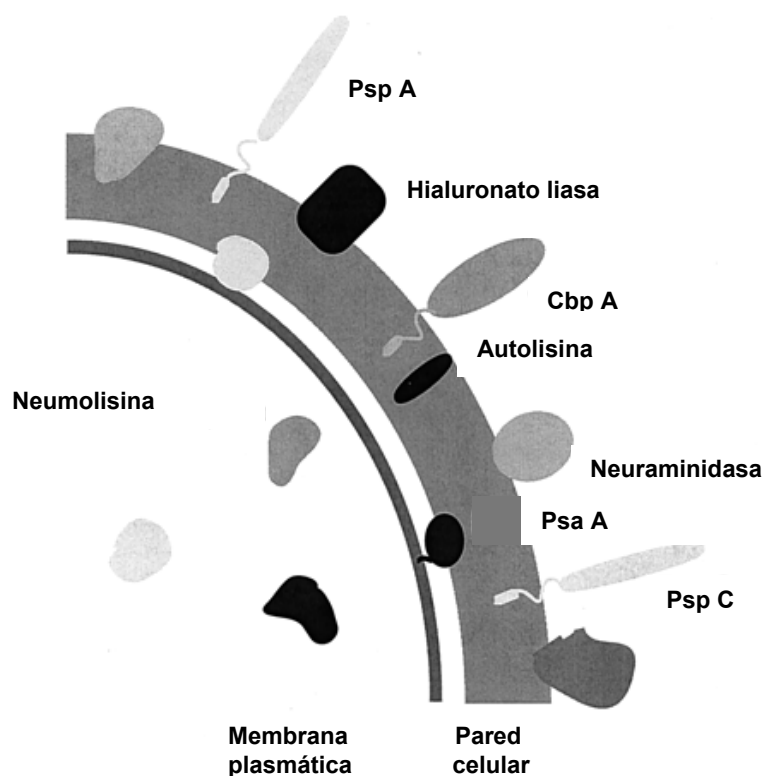


Figura 7. Modelo esquemático de la superficie de *S. pneumoniae*. Extraído y modificado de Jedrzejewski MJ *et al* 2001.

3.2. Mecanismos de defensa del hospedador.

Atendiendo a la relación del oído medio con el aparato respiratorio, se describen en el siguiente apartado los principales mecanismos defensivos, clasificados en inespecíficos (respuesta constitutiva) y específicos (respuesta adaptativa).

3.2.1. *Mecanismos de defensa inespecíficos.*

En este grupo se engloban diversos mecanismos que no requieren una exposición previa al patógeno, ya que reconocen en él unas secuencias específicas altamente conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs. El hospedador reconoce estos PAMPs mediante los receptores de reconocimiento de patógenos (Beutler B 2003). Estos sensores específicos incluyen los receptores Toll, los cuales son esenciales en la respuesta fagocítica ya que intervienen en la maduración del fagosoma (Hirano T *et al* 2007).

3.2.1.1. *Barreras anatómicas.*

La piel y las mucosas constituyen la primera línea defensiva frente a los microorganismos (Prescott LM 2003). El efecto deshidratante y el pH ligeramente ácido de la piel conforman un ambiente protector contra muchos patógenos. Las secreciones de las membranas mucosas pueden contener sustancias antimicrobianas, inhibidores del tipo de las defensinas, inmunoglobulinas (principalmente IgG e IgA) con capacidad aglutinante o proteínas de unión a hierro (Tramont EC and Hoover DL 2000).

El acceso al oído medio a través del canal externo se encuentra limitado por la membrana timpánica. Desde el canal externo, piel y mucosa actúan como defensas mecánicas. El oído medio se encuentra recubierto por epitelio respiratorio y contiene células ciliadas, células globulares secretoras de mucus y células secretoras de inmunoglobulinas (Klein JO 2000). Los aspectos referidos a la actividad mucociliar del epitelio se describen más adelante en el apartado **3.2.1.3.**

Por otro lado, la microbiota normal que coloniza piel y mucosas constituye un ecosistema crítico que protege al hospedador de organismos patógenos por 1) competición por los nutrientes y los receptores celulares, 2) producción de antibióticos propios y metabolitos tóxicos para otros microorganismos, 3) estimulación continua del sistema inmune y de la respuesta específica.

La microbiota normal de la nasofaringe es resultado de una colonización temprana de la misma tras el nacimiento (Pirincipi N *et al* 1999) e incluye organismos aerobios y anaerobios, desde bacterias comensales (Brook I 2002), hasta patógenos potenciales, entre los que se halla una elevada carga de *S. pneumoniae* (Leiberman A *et al* 1999). Estas bacterias y, especialmente los estreptococos α -hemolíticos, inhiben el crecimiento de posibles patógenos.

En último lugar, la propia trompa de Eustaquio también desempeña un papel defensivo, realizando tres funciones fisiológicas respecto al oído medio: 1) aislar de las secreciones de la nasofaringe, 2) drenar las secreciones producidas en el oído medio y 3) ventilar la cavidad y mantener en equilibrio la presión entre canal externo y el oído medio. El fallo en alguna de estas funciones conlleva una acumulación de fluido y una posible infección en el oído medio (Klein JO 2000)

3.2.1.2. Péptidos antimicrobianos inespecíficos.

En este apartado se incluyen una serie de sustancias consideradas como barreras químicas ante los microorganismos.

- La lisozima es una enzima producida por el epitelio respiratorio con actividad muramidasa. Hidroliza el enlace del ácido N-acetilmurámico con la N-acetilglucosamina en el peptidoglicano, sobre todo en microorganismos Gram positivos (Prescott LA 2003). Se cree que la producen tanto PMNs como células secretoras de lisozima presentes en el epitelio del oído medio y la trompa de Eustaquio (François M 1997).
- La lactoferrina (transferrina) es una proteína quelante de hierro. La captura del hierro por este tipo de proteínas impide que microorganismos que carecen de mecanismos para adquirirlo por otras vías puedan emplearlo (a diferencia de microbiota normal de piel y mucosas).

- La fibronectina es una glucoproteína que se une a ciertos componentes de la superficie bacteriana, facilitando la eliminación de la bacteria e impidiendo su adhesión al interactuar con los receptores de las células epiteliales.
- Los polipéptidos catiónicos (β -Lisina, leucinas, plaquinas y fagocitinas) alteran la membrana plasmática de bacterias Gram positivas y las destruyen.
- Las defensinas son unas proteínas contenidas en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos que permeabilizan las membranas de las bacterias creando canales de membrana dependientes de voltaje, lo cual permite la salida de iones (Prescott LA 2003). La β -defensina 2 es activa contra *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*.
- Las citoquinas incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF- α) que podría actuar en mecanismos de resistencia del hospedador frente a *S. pneumoniae* (Kirby AC *et al* 2005) o las interleucinas IL 1- β , IL6 e IL8 inductoras de inflamación y apoptosis (Malley R *et al* 2003, Mitchell TJ 2003).
- Opsoninas como la proteína C reactiva o CRP que se une a la fosforilcolina de los TAs (Mold C *et al* 2002) o la proteína de unión al polisacárido implicada en síntesis de citoquinas por inducción de los LTAs del neumococo.(Schroder NW *et al* 2003).
- El sistema del complemento engloba más de 20 proteínas que actúan en cascada. Está implicado en fagocitosis, producción de citoquinas y opsonización (Tramont EC and Hoover DL 2000).

3.2.1.3. Actividad mucociliar.

La trompa de Eustaquio y el oído medio están recubiertos de un epitelio de células ciliadas y secretoras de mucus encargadas de atrapar y expulsar cuerpos extraños (François M 1997). El movimiento de los cilios de la cavidad nasal está dirigido hacia la faringe. El moco con los microorganismos atrapados es desplazado hacia la boca y de esta forma se produce la expulsión de los mismos. Por otro lado, la salivación limpia la boca y la nasofaringe arrastrando a los microorganismos hacia el estómago (Prescott LM 2003).

Una disfunción de este epitelio respecto al oído medio conlleva: 1) acumulación de secreciones en el oído medio, lo que crearía un ambiente adecuado para la multiplicación de la bacteria y 2) mantenimiento de la inflamación al no poder retirar adecuadamente el fluido infectado (Klein JO 2000).

3.2.1.4. Líquido de revestimiento.

Las vías respiratorias están recubiertas por un líquido rico en opsoninas (fibronecitas, complemento, surfactante e IgG) y sustancias con acción bactericida (ácidos grasos libres, lisozimas, transferrina). El surfactante es un modulador de las funciones del macrófago, citoprotector y antioxidante. La IgG actúa como aglutinador o bien bloquea la unión de los microorganismos a los receptores celulares del hospedador (Tramont EC and Hoover DL 2000).

3.2.1.5. Macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN).

El sistema mononuclear fagocítico (macrófagos, macrófagos tisulares, y monocitos) y los PMN constituyen la segunda línea defensiva contra los patógenos. Los microorganismos son reconocidos por las células fagocíticas y se unen a ellas de manera inespecífica. Posteriormente son fagocitados, englobados en el interior de la vacuola fagocítica o fagosoma y digeridos en la fusión de los lisosomas con el fagosoma.

El proceso inflamatorio propicia que los fagocitos migren hacia la zona afectada. Además estimula la producción de neutrófilos y granulocitos vía IL-1, fragmentos del complemento y promotores de leucocitosis.

La fagocitosis puede verse favorecida por otros procesos físicos. La humidificación del aire en la cavidad nasal provoca la hinchazón de organismos higroscópicos, haciéndolos susceptibles al proceso (Prescott LM 2003).

Aunque *S.pneumoniae* puede ser destruido por fagocitosis, este mecanismo no siempre funciona en casos de OMA. Parece que el neumococo no se fagocita bien ni en sangre periférica ni por los fagocitos del oído medio (François M 1997).

3.2.2. Mecanismos de defensa específicos. Respuesta inmune.

Los mecanismos de defensa específicos del hospedador engloban dos tipos de respuesta (humoral y celular) cuya actuación en la OMA no está del todo clara.

La mucosa del oído medio contiene solo unas pocas células inmunocompetentes y la síntesis de anticuerpos específicos durante la infección es local (en las células plasmáticas del oído medio). El proceso se acompaña de una actividad secretora de las células epiteliales del oído medio, también a nivel local (François M 1997).

Los anticuerpos que aparecen en una OMA producida por *S.pneumoniae* son principalmente IgG e IgM y, en un proceso más avanzado, IgA. Deficiencias en las IgG se han asociado con infecciones recurrentes del tracto respiratorio (Ozkan H *et al* 2005) Hasta los primeros 6 meses de vida, el niño goza de la protección que le ofrecen las IgG maternas, las concentraciones máximas de IgG, IgM e IgA no se alcanzan hasta una infancia tardía, lo cual deja una amplia ventana de tiempo donde el niño es susceptible al desarrollo de OMA. La respuesta inmune al patógeno causal es bastante pobre y los niveles de anticuerpos hallados en el suero son bajos. Por otro lado, la correlación entre los niveles de anticuerpos en el oído medio y en el suero obtenidos en algunos estudios clínicos sugiere que los anticuerpos hallados en la fase más temprana de la OMA podrían llegar desde el suero por un mecanismo de transudación.

La respuesta inmune humoral desempeña un pequeño papel en la prevención de posteriores infecciones pero en casos de OMA recurrente puede contribuir al acúmulo y la permanencia de líquido en el oído medio. En modelos experimentales se ha observado además que la administración de antibióticos sistémicos puede interferir con la respuesta inmune del oído medio (François M 1997).

3.3. Colonización e invasión microbiana.

La patogénesis de la OMA es compleja y multifactorial. La colonización bacteriana depende tanto de la bacteria como del hospedador, así como de una serie de factores ambientales (François M 1997).

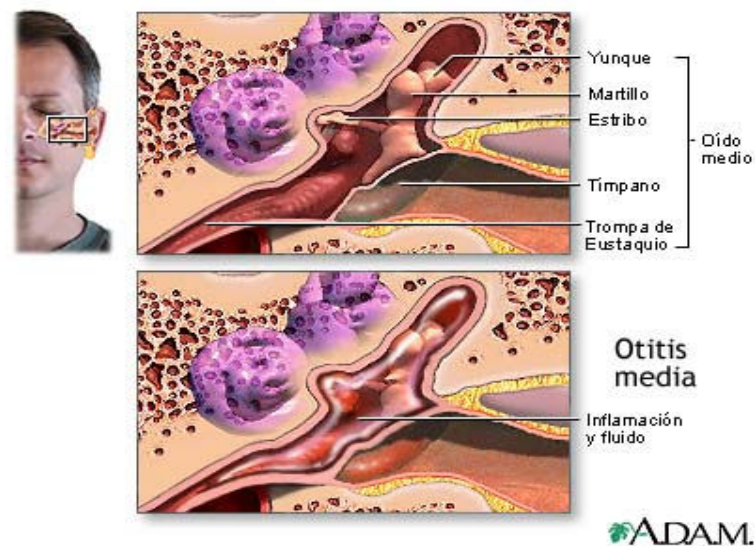


Figura 8 . Modelo de infección del oído medio. Imagen extraída de
<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/163/1/Otitis-Media-Secretora>

El oído medio es una cavidad que forma parte de un sistema continuo que incluye las narinas, la nasofaringe, la parte media y anterior de la trompa de Eustaquio y las células mastoideas posteriores (Klein JO 2000). Se comunica con las vías respiratorias altas a través de la trompa de Eustaquio, de tal forma que la infección se desarrolla cuando las bacterias colonizadoras del tracto nasofaríngeo ascienden por la trompa de Eustaquio hasta el oído medio. En este sentido influyen tanto el tamaño del inóculo como el mal funcionamiento de los mecanismos defensivos. Se barajan tres hipótesis acerca de los mecanismos de infección (François M 1997):

- Por aspiración de las bacterias patógenas hacia el interior del oído medio, al establecerse una presión negativa que induce la apertura de la trompa de Eustaquio.
- Por inyección propiciada por un aumento de presión al estornudar o al exhalar el aire fuertemente. Podría deberse a la existencia de una presión residual del oído medio más baja tras el cierre y un mal funcionamiento de la trompa de Eustaquio.
- Por diseminación continua o avance gradual de las bacterias desde el tracto nasofaríngeo hasta el oído medio, proceso que podría estar facilitado por virus o metabolitos de las propias bacterias.

3.4. Reacción del hospedador.

La infección en el oído medio es local e implica cambios estructurales, una respuesta inflamatoria mediada principalmente por mecanismos defensivos innatos o inespecíficos y supuración.

Los cambios estructurales en el oído medio producidos durante la infección aguda evolucionan conjuntamente con el avance de la misma pasando por fase aguda, sub-aguda y crónica. En una OMA temprana, la mucosa del oído experimenta aumento de la permeabilidad capilar, edema de la lámina propia e infiltración leucocítica (Wright CG and Meyerhoff WL 1994). En modelos experimentales se ha observado inflamación temprana y aumento del número de células ciliadas y secretoras (Widemar L *et al* 1986).

La infección y el mal funcionamiento de la trompa de Eustaquio, inducen la secreción de mediadores inflamatorios que mantienen una respuesta inflamatoria sostenida aumentando la permeabilidad vascular y estimulando la capacidad secretora del epitelio. Los mediadores inflamatorios implicados son:

- Eicosanoides: Abundantes en OMAs de tipo purulento.
- Citoquinas: Presentes en formas purulentas y tempranas de OM.
- Histaminas: Aparecen en OMAs persistentes, por presencia de la bacteria en el líquido del oído medio, asociación a una infección viral o cuando se produce un fracaso terapéutico. (François M 1997).

Por otro lado, la liberación de radicales libres vía neutrófilos y la acumulación local de inmunocomplejos que promueven la activación del complemento, cooperan en el mantenimiento de esta respuesta inflamatoria sostenida.

La mucosa del oído medio produce secreciones de manera continua. Si la Trompa de Eustaquio se encuentra comprometida, se genera una obstrucción que provoca la acumulación de estas secreciones. Cuando el patógeno está presente, se produce una OMA supurativa (Klein JO 2000). Aparte de células, bacterias y secreciones glandulares el fluido del oído medio contiene productos de células inflamatorias.

En la eliminación de la bacteria y/o el fluido intervienen los mecanismos defensivos inespecíficos y específicos vistos en el apartado 3.2. La quimiotaxis y la fagocitosis pueden verse impedidas durante la OMA debido a la ausencia de anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente. La red de fibrina facilita la fagocitosis en secreciones purulentas y ciertos productos (transferrina, ácido láctico, lisozima) actúan como bactericidas o bacteriostáticos. Los cilios presentes en la mucosa limpian y drenan la zona (François M 1997). Gracias a estos mecanismos defensivos del hospedador, la OMA tiende a resolverse espontáneamente. La tasa de resolución espontánea de OMA entre los días 5 y 7 se sitúa en torno al 85% (Grenier B 1997) si bien esto solo es cierto entre el 16 y 20% de las OMAs ocasionadas por neumococo (Del Castillo F *et al* 2007, Gala López Gozález *et al* 2006).

4. DIAGNÓSTICO DE LA OMA.

4.1. Clínico.

El diagnóstico clínico de la OMA debe efectuarse en base a tres criterios (AAP & AAFP 2004): 1) presentación aguda, 2) presencia de líquido en el oído medio (demostrada por otorrea) y 3) existencia en el momento de la exploración de síntomas y signos inflamatorios del oído medio. A pesar de ser una buena propuesta no es definitiva, ya que lleva a dos situaciones posibles de diagnóstico (Del Castillo F *et al* 2007):

- OMA confirmada: Cumple los tres criterios establecidos. Se considera cuando aparecen otorrea y otalgia agudas (síntomas recientes, exudado e inflamación) y/o cuando la afección se acompaña de infecciones recientes de las vías altas.
- OMA probable: No se cumplen todos los criterios, pero la posibilidad de OMA es elevada. Hay otalgia sin confirmarse la presencia de fluido en el oído medio, o se observa presencia de fluido pero sin otalgia. La otalgia es importante a la hora de diferenciar una OMA de una OMD, ya que el dolor se considera un rasgo distintivo de la OMA pero por otro lado es difícil reconocerla en niños muy pequeños, aunque en estos casos se han observado otros datos como despertar brusco, llanto o irritabilidad diurna prolongada (Del Castillo F y Martín F 2002). Su valoración depende del criterio del pediatra (Del Castillo F *et al* 2007).

4.2. Otoscópico.

El diagnóstico rutinario de la OMA se suele realizar atendiendo tanto a los datos clínicos como a la imagen otoscópica, ya que, aproximadamente en un tercio de los casos, la OMA cursa de forma subclínica.

En el diagnóstico mediante la imagen otoscópica se considera el aspecto que presenta la membrana timpánica. Un tímpano normal tiene una posición oblicua, un color ambar translúcido, reflejos de luz, marcas osculares y es distensible (Morfin BM 1999). Durante una OMA, se aprecian, en la membrana timpánica, cambios en su situación (abombamiento o retracción) y color (de amarillo a rojo), presencia de exudado, y/o ampollas timpánicas, burbujas retrotimpánicas y otras estructuras (quistes, granulaciones, cuerpos extraños), eritema y esclerotización u opacidad de la membrana timpánica.

La presencia de líquido en el oído medio se suele confirmar con la otoscopia neumática. Con esta técnica se estudia la movilidad de la membrana timpánica, que disminuye ante la presencia de fluido en el oído medio. El cerumen debe ser previamente retirado mediante limpieza del conducto o por irrigación de la zona con Cerumenex® (un condensado de oleato polipeptídico de trolamina) y aclarado con agua templada para evitar el vértigo (excepto con perforación) para obtener la visualización completa de la membrana timpánica que requiere la técnica

Se recomienda precaución en el diagnóstico en cuanto a que: 1) una membrana enrojecida puede estar causada también por una infección viral, una situación de estrés o por la irritación causada por la retirada del cerumen con un hisopo, 2) se puede confundir una OMD como una OMA. La OMD es más frecuente que la OMA y puede cursar asociada a una infección viral, como preludio de OMA o como secuela de la misma (Berman S 1997).

4.3. Microbiológico.

El diagnóstico microbiológico se efectúa realizando un cultivo de las muestras de fluido del oído medio extraídas mediante timpanocentesis. La identificación de la bacteria en el laboratorio se lleva a cabo teniendo en cuenta los procedimientos descritos en el apartado 2.1. La timpanocentesis repetida, además de un procedimiento diagnóstico, puede considerarse terapéutica cuando hay problema de drenaje en el oído medio. El uso de la técnica es poco frecuente, pese a considerarse esencial tanto para el diagnóstico y como ayuda para el tratamiento de la OMA (Musher DM 2001).

4.4. Otros.

La timpanometría confirma los resultados otoscópicos y detecta presencia de líquido en el oído medio. Se basa en la medida de la presión existente en el oído medio, en función de la cual se establecen tres patrones o timpanogramas:

- Tipo A: Membrana timpánica normal, ausencia de líquido y buena audición.
- Tipo B: La membrana timpánica está inmovilizada por causas diversas (obstrucción por cerumen, presencia de fluido, perforación, etc)
- Tipo C: La membrana timpánica tiene movilidad, pero hay una disfunción del conducto auditivo y una excesiva presión negativa. Se relaciona con la presencia de fluido en el oído medio (aproximadamente el 20 % de los pacientes). No se descarta ni confirma la presencia de líquido.

La ventaja que ofrece esta técnica frente a la otoscopia neumática es que no requiere la retirada del cerumen, puesto que no se precisa la visualización total de la membrana timpánica (Berman S 1997). Por otro lado, tiene como inconvenientes que se realiza con un instrumento no portátil y que requiere un manejo experimentado. En ocasiones no es aplicable, ya que el dolor impide tolerar la presurización que se requiere para efectuar la técnica (Salas R y Silva C 2006).

La reflectometría acústica emplea un instrumento (reflectómetro acústico) que funciona como un sónar en miniatura, informando del estado físico del oído medio y la posible existencia de fluido. Se trata de un método objetivo para detección de OMD y también se usa para descartar la presencia de fluido en el oído medio. Tiene una elevada especificidad en relación con la timpanometría, pero por su baja sensibilidad precisa complementarse con esta técnica cuando los datos de la reflectometría se consideran alterados. Como ventajas respecto a otras técnicas se consideran su utilidad, bajo coste y fácil manipulación (Salas R y Silva C 2006).

5. COMPLICACIONES DERIVADAS DE LA OMA.

La mayoría de las OMAs tienden a resolverse de manera espontánea pero ocasionalmente pueden complicarse. Se estima que un 25% de los pacientes con OMA presenta complicaciones y un 2% desarrolla complicaciones intracraneales supurativas (del Castillo F *et al* 2007).

La OMC se desarrolla a partir de una OMA en un 5-10% de los casos (Ripley-Petzoldt ML *et al* 1988) cuando la otorrea persiste durante más de 6 semanas (Bluestone CD 1998). La cronificación no depende solo del mal funcionamiento de la trompa de Eustaquio, sino también de componentes subcelulares de la bacteria (Karma P *et al* 1985) vistos en el apartado 3.

La pérdida de audición sensineural ocurre en raras ocasiones y parece causada por una disminución de la permeabilidad de la membrana de la ventana oval en la zona temporal (del Castillo F *et al* 2007). Este fenómeno es responsable de fallos en las habilidades cognitivas y retraso del desarrollo (Klein JO 2000). La parálisis facial también se produce en raras ocasiones y es consecuencia de la compresión y el edema del nervio facial (del Castillo F *et al* 2007).

Actualmente, el acceso a los cuidados médicos ha propiciado que las secuelas supurativas de la OMA tales como laberintitis, mastoiditis, complicaciones intracraneales y meningitis sean poco frecuentes. La mastoiditis es clínicamente rara desde la introducción de los antimicrobianos, aunque en los últimos años su incidencia se ha incrementado (Dudkiewicz M *et al* 2005).

6. EPIDEMIOLOGÍA.

6.1. Incidencia.

La OMA es la mayor causa de morbilidad en niños (Rovers MM et al 2004) y la enfermedad infantil más común entre las que requieren tratamiento antimicrobiano (Mandel EM and Casselbrant ML 2004). Más de un 90 % de los niños ha padecido algún episodio de OMA antes de los 5 años (Pereira MB and Ramos BD 1998).

La mayoría de los episodios de OMA tiene lugar entre los 6 y los 24 meses de edad. Aunque la incidencia de OMA disminuye con la edad, existe un período de aumento de la misma que coincide con el inicio de la etapa escolar del niño. Los casos en adultos son poco frecuentes (Klein JO 2000).

El estudio de la incidencia de OMA es complicado a causa de los siguientes factores: 1) dificultad del diagnóstico en los lactantes debido a un curso asintomático de la enfermedad, 2) existencia de un sobrediagnóstico ante la incapacidad de distinguir un episodio agudo de una OMD, 3) una elevada tasa de resolución espontánea que conlleva a que muchos casos no se registren y 4) la dificultad para distinguir entre una nueva infección y otra recurrente (Baraibar R 1997).

6.2. Patrón temporal.

El aumento de la incidencia de la OMA en los meses de invierno es paralelo al aumento de la incidencia de infecciones del tracto respiratorio superior (Kim PE *et al* 1996). Los niños nacidos en otoño son más propensos a desarrollar conjuntivitis y OMA recurrente (Homoe P *et al* 2005).

6.3. Reservorio.

Las bacterias presentes en el tracto nasofaríngeo constituyen uno de los principales reservorios del patógeno, ya que la infección se produce cuando se diseminan a través de la trompa de Eustaquio (apartado 3.3). La existencia de infecciones en el seno familiar y la presencia de hermanos que han desarrollado episodios de OMA (Baraibar R 1997), así como las guarderías (Nandí-Lozano E *et al* 2002) son otros reservorios además de factores de riesgo, como se comenta en el apartado 6.5.2.

6.4. Transmisión.

El neumococo se transmite con facilidad a través de las gotitas de saliva. La difusión aumenta durante el curso de infecciones respiratorias con presencia de tos y aumento de secreciones (Prado V 2001).

6.5. Factores de riesgo.

La predisposición para desarrollar episodios de OMA viene determinada tanto por factores dependientes del hospedador como por factores ambientales (Baraibar R 1997).

6.5.1. Factores dependientes del hospedador.

Algunos de ellos son:

- El sexo: La incidencia de la OMA es mayor en varones, quizá debida a los bajos niveles de Ig G₂ hallados en el sexo masculino, asociados a una menor producción o a una maduración tardía de esta inmunoglobulina (Matsuoka A 1994).
- La etnia: La frecuencia de la OMA varía en función de la etnia (Klein JO 1994). Diferencias estructurales en la trompa de Eustaquio entre los diferentes grupos étnicos podrían influir en la diseminación de las bacterias al oído y por tanto en la incidencia de la enfermedad en determinadas poblaciones (Baraibar R 1997).
- La edad: La OMA suele ser una enfermedad de la infancia temprana y la edad en la que se produce el primer episodio condiciona su recurrencia (Teele DW *et al* 1989). La incidencia de OMA es mayor entre niños de nacimiento prematuro y alcanza hasta el 63% en niños ≤ 2 años (Williamson I *et al* 2006). Este fenómeno podría deberse a características estructurales en la anatomía de la trompa de Eustaquio, la propia anatomía del cráneo y la presencia de malformaciones (Baraibar R 1997).
- La situación familiar: La posibilidad de desarrollar OMA se incrementa en niños que tienen hermanos mayores con infecciones recurrentes del oído medio (Baraibar R 1997). Este incremento también es función del orden de nacimiento; el segundo hijo tiene una mayor probabilidad de desarrollar OMA debido a la exposición a infecciones respiratorias desarrolladas en el seno familiar (Wright PF *et al* 1995). No hay una relación aparente entre la aparición y la recurrencia de la OMA con el número total de hermanos (Teele DW *et al* 1989).

6.5.2. Factores ambientales.

Se incluyen factores que establecen una relación directa con el desarrollo de la OMA y factores que levantan una mayor controversia debido a las discrepancias obtenidas a nivel estadístico. Algunos de ellos son:

- La duración del amamantamiento: La lactancia materna se relaciona con un descenso de la incidencia y del riesgo de recurrencia de OMA (Duncan B *et al* 1991). Se ha sugerido una relación inversa entre el desarrollo de OMA y el tiempo de amamantamiento (Aniansson G *et al* 1994).
- El humo y los contaminantes ambientales: Los efectos del humo del tabaco incluyen cambios estructurales y fisiológicos del tracto respiratorio y disfunción pulmonar (Stenstrom R *et al* 1993). Los niños con madres fumadoras presentan el doble de riesgo de desarrollar infecciones respiratorias durante los dos primeros años de vida (Grubber WC 1995). Sin embargo, no hay estudios suficientes acerca de la influencia de los contaminantes ambientales en la incidencia de la OMA (Baraibar R 1997).
- La época estacional: Existe relación entre la incidencia de la enfermedad y la estación del año, con más casos en primavera, otoño e invierno (Baraibar R 1997).
- Los factores socioeconómicos y la accesibilidad a la supervisión médica: Las clases sociales con menor poder adquisitivo tienen una mayor tasa de incidencia de infecciones del tracto respiratorio y del oído crónicas que las clases más altas, con mayor acceso a la supervisión médica (Baraibar R 1997, Castagno LA and Lavinsky L 2002). Por otro lado, la elevada tasa de curación espontánea de la otitis propicia que muchos episodios no sean diagnosticados (Baraibar R 1997).
- El cuidado del niño en las guarderías: El contacto que mantienen los niños en las guarderías propicia la transmisión y la amplificación de infecciones víricas y bacterianas, incluyendo la OMA. (Baraibar R 1997). Las guarderías son un factor de riesgo en la transmisión de *S. pneumoniae* resistente a penicilinas (Nandí-Lozano E *et al* 2002).

Otros estudios valoran otro tipo de factores como el uso de chupetes, ya que se dan casos de OMA recurrente en niños que lo usan un tiempo prolongado (Niemela M *et al* 2000), la postura adoptada en la toma del biberón, con una mayor incidencia de OMA entre niños que lo toman acostados o el hábito de respirar por la boca, que aumenta la incidencia de OMA (Baraibar R 1997). También se han asociado con un aumento de la incidencia de OMA el fracaso de la terapia debido a la incorrecta administración del tratamiento antimicrobiano y la influencia del estado inmunológico del paciente (Baraibar R 1997), siendo la incidencia de OMA mayor en niños inmunodeprimidos con enfermedades crónicas como la diabetes (Morfin BM 1999) o VIH (Barnett ED *et al* 1992).

7. TRATAMIENTO DE LA OMA.

7.1. Criterios de aplicación del tratamiento.

El establecimiento de un régimen de tratamiento antimicrobiano para la OMA atiende a: 1) la necesidad de un correcto diagnóstico donde el especialista haga una buena discriminación entre OMA y OMD, ya que para esta última la prescripción de antibióticos se considera innecesaria (AAP & AAFP 2004) y 2) el aumento de la resistencia a los antibióticos entre los patógenos aislados en una OMA (Baquero F *et al* 1997).

Los principales puntos de controversia en el establecimiento de la terapia para niños diagnosticados de OMA sin complicación son los siguientes:

1- La prescripción o no de antibióticos tras el diagnóstico.

La administración temprana del antibiótico (protocolo de rutina en los EEUU) se justifica en base a evitar el fracaso de la terapia o la aparición de complicaciones como la meningitis (AAP & AAFP 2004). El tiempo transcurrido hasta el inicio del tratamiento influye en el efecto bactericida del antibiótico (Gerber AU *et al* 1991). En el caso de OMA, la administración precoz del antibiótico mejora los síntomas después de las 24 primeras horas, si bien estos ya están comenzando a resolverse espontáneamente (Little P *et al* 2001).

El tratamiento de los síntomas y la restricción de antibióticos a los casos donde el paciente no experimente mejoría tras un período de observación previo (Siegel RM *et al* 2005, Marchetti F *et al* 2005) es deseable, ya que: 1) disminuye los problemas derivados del uso de los antibióticos (aparición de resistencias, efectos secundarios y elevados gastos médicos), 2) es sencillo y aceptable para los padres (Little P *et al* 2001) y 3) y aceptable, puesto que el tratamiento precoz con antibióticos parece que no influye en la incidencia de meningitis y mastoiditis (AAP & AAFP 2004). Para aplicar esta estrategia se valoran la fiabilidad del diagnóstico, la edad del paciente (en ocasiones), la severidad de la afección y la certeza del seguimiento del caso. La AAP & AAFP recomienda que niños menores de 6 meses reciban tratamiento antimicrobiano siempre, entre 6 meses y 2 años ante certeza de OMA u OMA severa y mayores de 2 años únicamente ante una OMA severa.

2- La duración de la terapia y su influencia en el curso de la enfermedad.

En algunos estudios se sugiere mantener el tratamiento durante un período de 10 días. Según la AAP & AAFP, lo correcto es mantener la terapia durante este tiempo para niños menores de 2 años o niños con OMA severa. También se recomienda este régimen para niños de 2 a 5 años, ya que aunque no se obtienen resultados tan significativos tras la aplicación de la terapia, parece que sí existe un aumento de la eficacia. Niños de 6 años o mayores con una OMA moderada, podrían disminuir este tiempo entre 5 y 7 días. Previamente, se establece un período de observación de 48-72 horas para valorar la respuesta al tratamiento, ya que si esta es nula habría que considerar otro diagnóstico o cambiar el tratamiento elegido, que podría no ser el adecuado (AAP & AAFP 2004).

7.2. Tratamiento con antimicrobianos.

El empleo de antimicrobianos en la OMA se acoge a los tres pilares básicos de la farmacoterapia clínica, farmacocinética, farmacodinamia y farmacovigilancia (Cruz 1994). Se busca: 1) garantizar la eficacia del antimicrobiano, 2) reducir su toxicidad y 3) minimizar cuanto se pueda el riesgo de selección de resistencias (Soriano F 2006).

La capacidad de un fármaco para ejercer su acción depende de que este alcance una concentración crítica en los órganos y tejidos sobre los que lleva a cabo su efecto terapéutico. Cuando se administra un fármaco se precisa que este penetre en el organismo, llegue al plasma y se distribuya en los tejidos. Una vez administrada la dosis del fármaco, la concentración inicial disminuye debido a procesos de eliminación (Honorato Pérez J *et al* 1999). El estudio de la farmacocinética y la farmacodinamia, el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del fármaco permiten predecir las concentraciones plasmáticas del mismo a distintos tiempos post-administración y estimar tanto la magnitud como la duración de la respuesta experimentadas. Cuando el fármaco es un antibiótico se valoran tanto sus efectos diana sobre el microorganismo contra el que va dirigido como su toxicidad o efectos sobre las células del hospedador (Soriano F 2006).

7.2.1. Conceptos de farmacocinética y farmacodinamia.

La farmacocinética (PK) estudia la evolución temporal de la concentración de los fármacos en el organismo y su relación con la respuesta farmacológica en modelos experimentales adecuados (Pérez JH *et al* 1999) desde su administración hasta su eliminación (Soriano F 2006).

La farmacodinamia (PD) estudia la interacción del fármaco con los microorganismos y el hospedador. Sobre los microorganismos, los antibióticos pueden tener un efecto bacteriostático (inhibiendo su crecimiento y multiplicación) o bactericida (destruyéndolos). La diferencia de efecto o actividad depende tanto de: 1) el mecanismo de acción del antimicrobiano, como 2) la concentración del antibiótico considerada.

La actividad bactericida de un antibiótico puede estar en función de la duración temporal del contacto antibiótico-microorganismo infectante a concentraciones superiores a las de la concentración mínima inhibitoria o CMI (antimicrobianos tiempo-dependientes) o bien en función de la existencia de concentraciones muy por encima de la CMI del microorganismo (antimicrobianos concentración-dependientes). En el primer caso, la máxima actividad bactericida se consigue con concentraciones 4-5 veces la CMI, sin que se registre una mayor actividad con el aumento en la concentración. En el segundo caso, aumentando la concentración, se incrementa proporcionalmente su actividad bactericida (Soriano F 2006).

7.2.2. *Parámetros farmacocinéticos.*

Mediante la valoración de los distintos parámetros farmacocinéticos se puede prever el curso temporal de las concentraciones plasmáticas y diseñar una pauta lógica de administración de un fármaco.

La absorción implica la llegada del fármaco al sistema vascular y tiene lugar cuando el este se administra por una vía diferente de la intravenosa (iv) o directamente en compartimentos acuosos fisiológicos. El fenómeno se produce en una administración por vía intramuscular (im), subcutánea (sc), oral (or) o rectal (rc) entre otras. Es una variable en relación al tiempo, y la concentración máxima (C_{max}) expresada en mg/L o $\mu\text{g/ml}$ se alcanza después de un tiempo (T_{max}) indicado en horas o minutos.

La absorción depende de. 1) las propiedades del mismo fármaco (mejor absorción de antibióticos liposolubles en general), 2) la existencia de canales o sistemas que permitan el paso del fármaco al sistema circulatorio y 3) los mecanismos fisiológicos y la situación clínica del paciente.

La absorción suele ser saturable y restringida, si bien existe una absorción no saturable que permite el paso libre de los fármacos. La cantidad de fármaco que puede ser absorbida se conoce como tasa de absorción (K_a).

La biodisponibilidad (F) es la cantidad de fármaco que se absorbe y alcanza la circulación sistémica de forma inalterada. Se establece que un fármaco tiene el 100% de biodisponibilidad cuando se administra por vía iv, por lo que se puede conocer su biodisponibilidad al administrarse por otras vías. Se habla de alta biodisponibilidad (>80%) o baja disponibilidad (<50%) de un fármaco cuando se comparan las diferencias existentes entre las concentraciones séricas alcanzadas por el fármaco en esa modalidad de administración frente a las obtenidas en una administración iv.

Absorción y biodisponibilidad pueden verse afectadas por factores tales como la interacción con otros fármacos o alimentos, enfermedades u otro tipo de interferencias (parasitosis, diarreas etc). La biodisponibilidad de un antibiótico puede ser afectada por el metabolismo del fármaco por la flora intestinal o por metabolismo parcial del mismo en el hígado tras una transferencia desde el intestino por la vena porta.

El área bajo la curva (ABC) es un parámetro farmacocinético que integra las concentraciones plasmáticas en relación al tiempo. Se expresa en $\mu \times \text{h/ml}$ o $\text{mg} \times \text{h/ml}$. Es dependiente de la dosis y de la vía de administración y está claramente relacionado con la biodisponibilidad ya que

$$F = \frac{ABC_{(ruta)}}{ABC_{(iv)}}$$

siendo F la biodisponibilidad, $ABC_{(ruta)}$ la magnitud de la absorción y $ABC_{(iv)}$ la tasa de absorción.

La distribución es un proceso reversible que implica el traslado del fármaco desde el compartimento vascular a los tejidos. La distribución no solo depende de las propiedades del fármaco (peso molecular, unión a proteínas, hidrofilia o lipofilia) y su dosificación, sino también de la situación clínica del paciente (Soriano F 2006).

El volumen de distribución (Vd) es el volumen teórico en que debería repartirse el fármaco para que una dosis alcance una determinada concentración en plasma (Pérez JH *et al* 1999). Es un factor que relaciona la cantidad de fármaco en el organismo con una concentración plasmática determinada en fase estacionaria y se expresa en L/kg o L (Soriano F 2006).

La unión a proteínas plasmáticas indica el porcentaje de fármaco que se une selectivamente a las distintas proteínas presentes en la sangre (Pérez JH *et al* 1999). La mayoría de los antibióticos se unen a proteínas plasmáticas en grado variable. Solo la fracción libre (no ligada a las proteínas) es microbiológicamente activa y tiene capacidad para difundir a espacios extravasculares.

La vida media ($t_{1/2}$) es el tiempo necesario para que la concentración de antibiótico se reduzca a la mitad durante su eliminación. Se emplea para calcular el tiempo que el antibiótico permanece en la sangre y suele expresarse en minutos u horas.

En la administración de un antibiótico por vía iv, la tasa de infusión deberá igualarse a la de eliminación para conseguir las concentraciones plasmáticas en estado estacionario (Css). La Css se puede calcular por la fórmula:

$$C_{ss} = \frac{1}{(K_{el} \times V_d)} \times \frac{(F \times D)}{T}$$

donde K_{el} es la constante de la tasa de eliminación, V_d es el volumen de distribución, F es la fracción del antibiótico realmente absorbida, D es la dosis administrada y T el intervalo de dosificación medido en horas (Soriano F 2006).

El metabolismo de los antibióticos puede conducir a transformaciones del medicamento (inactivación, activación o conversión en otra sustancia con actividad mayor, menor o igual a la del compuesto original) o a su conjugación con otras moléculas del hospedador. Algunos antibióticos no sufren alteración en el organismo y se eliminan prácticamente inalterados por vía renal, otros son metabolizados generalmente en el hígado, donde la capacidad es limitada y saturable, dándose dos situaciones: 1) si las concentraciones no son elevadas, el fármaco se metaboliza y 2) si las concentraciones superan la capacidad metabólica del hígado, el fármaco se acumula, pudiéndose alcanzar concentraciones séricas y titulares muy elevadas que dan lugar a efectos tóxicos. La mayoría de las transformaciones metabólicas dan lugar a un compuesto más polar que el original, lo que facilita su eliminación (Soriano F 2006).

La eliminación de la mayoría de los antibióticos suele ser renal. Algunos antibióticos se eliminan por vía biliar y en parte se pierden por las heces y en parte se reabsorben, siendo devueltos al hígado para finalmente excretarse por riñón e intestino. Otras rutas accesorias de eliminación son la saliva, la leche materna y el sudor entre otros (Pérez JH *et al* 1999).

La eliminación de los fármacos puede obedecer a: 1) una cinética de primer orden, donde la tasa de eliminación es proporcional a la concentración plasmática y cambia continuamente y 2) cinética de orden cero, que implica una eliminación a tasa constante independientemente de la concentración

Un problema en la eliminación del fármaco, puede provocar un aumento en las concentraciones y la vida media del mismo, lo que conlleva riesgo de toxicidad.

El aclaramiento (CL) de un fármaco se define como el resultado de dividir la tasa de eliminación en relación a la concentración plasmática y se expresa en L/h. Se relaciona tanto con Vd como con la vida media en la fórmula

$$CL = \frac{0,693 \times Vd}{t_{1/2}}$$

Cuando se analiza el perfil de las concentraciones séricas de un antibiótico se observa que, una vez alcanzada la C_{max} , la concentración empieza a disminuir. La disminución se debe a dos procesos, distribución y eliminación.

7.2.3. Índices farmacodinámicos.

La tasa C_{max} / CMI es un índice aplicado en antibióticos bactericidas y concentración dependientes, como aminoglucósidos (solos o asociados) y fluorquinolonas. La tasa óptima de eficacia suele estar entre 8-10, aumentando la actividad bactericida con índices superiores. Además, la obtención de tasas >10 para ambos grupos de antibióticos también se correlaciona con menor riesgo de selección de mutantes resistentes (ref).

El índice ABC / CMI también se correlaciona con la actividad bactericida de antibióticos concentración – dependientes. Para establecer el índice óptimo hay que diferenciar entre organismos gram-positivos y gram-negativos. Aunque en las infecciones neumocócicas se establece que índices entre 30-50 pueden ser suficientes, se sugiere que se alcancen sean índices superiores, similares a los considerados en gram-negativos. Índices > 100 se asocian a mayor eficacia terapéutica y bajo riesgo de selección de mutantes (ref).

El tiempo por encima de la CMI ($T > CMI$) se correlaciona con la eficacia de antibióticos cuya actividad bactericida es tiempo-dependiente. Las diferencias halladas en el intervalo de dosificación (referido al tiempo en el que la concentración del antibiótico excede la CMI del patógeno) entre diferentes antibióticos podrían deberse a la diferente actividad bactericida de cada compuesto (Soriano F 2006).

7.2.4. Correlación entre susceptibilidad *in vitro* y eficacia terapéutica.

La actividad *in vitro* de un antibiótico se estudia experimentalmente mediante la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB). CMI y CMB son los parámetros microbiológicos *in vitro* que más se correlacionan con la eficacia de los antibióticos.

In vivo se habla de eficacia clínica, que implica la mejoría de los síntomas a las 48-72 horas y eficacia microbiológica o ausencia de crecimiento del microorganismo en el cultivo del aspirado del oído medio a los 3-6 días, ambos, tras la administración del antibiótico (Dagan R *et al* 1997). Los antibióticos concentración dependientes pueden ser administrarse en dosis altas y a largos intervalos (cada 12-24 horas) y esta dosificación se correlaciona con eficacia terapéutica y con una menor toxicidad. Respecto a los antibióticos tiempo dependientes, el índice que mejor se correlaciona con la eficacia terapéutica es $T > CMI$, como se ha comentado en el apartado 7.2.3. En el tratamiento de la OMA con betalactámicos, macrólidos y cotrimoxazol, se ha demostrado una eficacia superior al 80% cuando $T > CMI$ era mayor del 40-50% del intervalo de dosificación. Este parámetro también se ha correlacionado con la eficacia de monobactamas, macrólidos, clindamicina y oxazolidinonas (Soriano F 2006).

7.2.5. Antibióticos empleados en la OMA.

El éxito del tratamiento antimicrobiano en la OMA depende de las concentraciones que alcance el fármaco en el oído medio y la vida media del mismo, que determinan el tiempo que las concentraciones permanecen por encima de la CMI del microorganismo.

Como se ha visto en el apartado 6.2, la OMA es una enfermedad típicamente infantil. Las edades extremas de la vida (niños y ancianos), la gestación y la lactancia son situaciones que pueden cursar con cambios en el comportamiento del fármaco. El continuo desarrollo físico en la infancia implica importantes modificaciones de los procesos farmacocinéticos, dependientes de la edad, que se suceden más rápidamente durante el primer mes de vida y a menor velocidad a medida que se produce el crecimiento. Se precisan ajustes en la dosificación y el ritmo de administración para conseguir la curación sin causar efectos indeseables.

Por tanto, la terapéutica antimicrobiana solo debe usarse cuando la patología está producida por un microorganismo sensible a los antimicrobianos disponibles y no puede curar espontáneamente (Azanza JR y Sádaba B 2006). Se sabe que la OMA tiene una curación espontánea del 80-90%, correspondiendo un 16% a los casos provocados por *S. pneumoniae*. La curación espontánea es inferior en niños menores de 2 años y la respuesta a la antibioterapia es mejor en casos de OMA grave. Niños pequeños con OMA, casos de OMA grave y pacientes con antecedentes familiares de secuelas óticas por OMA son los mayores beneficiarios de la antibioterapia (del Castillo F *et al* 2007).

Penicilinas.

Este grupo de fármacos constituyen la primera línea de actuación en casos de OMA. Su uso implica poco riesgo para el niño, de tal forma que se emplean sin adoptar precauciones especiales (Azanza JR y Sádaba B 2006).

Amoxicilina es el antibiótico de primera elección tanto para los casos que se tratan inicialmente tras el diagnóstico, como de aquellos que se han mantenido bajo un periodo de observación de 48-72 horas (AAP & AAFP 2004). La dosis mínima de amoxicilina es de 40-45 mg/kg/día y se recomienda en casos de OMA sin complicación o cuando el niño ha recibido 3 o más dosis de la vacuna conjugada heptavalente (Garbutt J *et al* 2006). La administración de amoxicilina a dosis elevadas, de 80-90 mg/kg/día consigue concentraciones en el oído medio capaces de erradicar neumococos sensibles, intermedios y resistentes a penicilina (Piglansky L *et al* 2003, del Castillo F *et al* 2007).

Amoxicilina asociada a ácido clavulánico a dosis de 90 / 10 mg/kg se considera el tratamiento de elección cuando se precisa cubrir un amplio espectro, ya sea en casos de resistencias (Dagan R *et al* 2001) como en casos producidos por *H. influenzae* o *M. catarrhalis* productores de betalactamasas (Jacobs MR 2001), si bien estudios actuales no garantizan la total cobertura para *H. influenzae* (Fenoll A *et al* 2007). La persistencia de fiebre y otalgia justificarían la aplicación de este tratamiento (AAP & AAFP 2004).

Cefalosporinas.

Este grupo de antimicrobianos son la segunda línea de actuación contra la OMA y constituyen una alternativa ante la existencia de reacciones alérgicas a la penicilina que no impliquen urticaria y anafilaxis (AAP & AAFP 2004). Las cefalosporinas, en principio, pueden emplearse en niños sin precauciones especiales, si bien su secreción activa respecto a la eliminación puede verse reducida sobre todo en el neonato, debido a la inmadurez de la función tubular, que se normaliza lentamente con el tiempo (Azanza JR y Sádaba B 2006).

Si no hay fiebre ni otalgia severa se pueden administrar cefpodoxima y cefuroxima a dosis de 10 y 30 mg/kg respectivamente (AAP & AAFP 2004). Las presentaciones orales de estas cefalosporinas tienen una buena actividad frente a *H. influenzae* y *M. catarrhalis* pero no estarían indicadas si la OMA está producida por neumococos resistentes a penicilinas (Jacobs MR 2001).

Un estudio sobre la farmacocinética / farmacodinamia de varios antimicrobianos realizado en España demostró que en OMAs causadas tanto por *S. pneumoniae* como *H. influenzae*, la mayor eficacia se conseguía con ceftriaxona (incluso con una dosis mínima de 50 mg / kg) y amoxicilina-ácido clavulánico (Beobide I *et al* 2005). No obstante, el uso de ceftriaxona en casos de OMA está restringido al ámbito hospitalario, excepto en casos excepcionales y bajo estricto control del especialista (del Castillo F *et al* 2007).

Macrólidos.

Los macrólidos también pueden emplearse en niños sin adoptar precauciones especiales. Tienen poca actividad frente a patógenos extracelulares presentes en el oído medio, debido a su elevada penetración intracelular (Beobide I *et al* 2005). Además las resistencias son elevadas, alcanzando en España porcentajes entre 30-50% (Pérez-Trallero *et al* 2005). Su uso se recomienda cuando se dan reacciones alérgicas de urticaria y anafilaxis (tipo 1) a los betalactámicos (AAP & AAFP 2004, del Castillo F *et al* 2007). Se emplean eritromicina (50 mg/kg/día), azitromicina (dosis de 10 mg/kg/primer día y dosis de 5mg/kg/día durante los 4 días siguientes) y claritromicina (15 mg/kg/día),

Otros antimicrobianos.

El cotrimoxazol (SXT) se compone de la asociación de trimetoprim con sulfametoxazol (antibacterianos de la familia de los antagonistas del ácido fólico) en una proporción fija de 1:5. Es un fármaco muy versátil y con un amplio espectro de actuación. En niños >2 meses con enfermedades del tracto respiratorio superior la dosis oral recomendada es de 6-10 / 30-50 mg/kg/día de trimetoprim y sulfametoxazol, respectivamente (<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074>), aunque se han propuesto hasta 2 dosis 8 / 40 mg/kg/día durante 10 días en caso de OMA (Chobillon AJ *et al* 2001).

Las oxazolidinonas comprenden una clase de agentes antimicrobianos que presentan una buena actividad *in vitro* frente a cepas de *S. pneumoniae* sensibles y resistentes a penicilina. Linezolid, que posee efecto post-antibiótico de 3 a 4 horas frente a estafilococos y estreptococos (Morejón M *et al* 2003), ha mostrado tasas de eficacia en OMA $\geq 72\%$ cuando se administra a dosis iguales o mayores de 10 mg/kg/2 veces día durante 5 días (William RH *et al* 2003).

La telitromicina es un ketólido derivado de la eritromicina A con actividad frente a neumococos resistentes a macrólidos y betalactámicos. Aunque hasta hace unos pocos años se aceptaba su empleo en casos de OMA, sinusitis y bronquitis crónicas debido a su amplio espectro antimicrobiano, los escasos efectos secundarios observados, una posología cómoda y unas características farmacocinéticas favorables (Klein JO 2000), recientemente la FDA ha restringido su uso a neumonías leves o moderadas adquiridas en comunidad ante la descripción de nuevos efectos secundarios (Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, DIGEMID 2008).

Tabla 1.- Principales antibióticos empleados en la OMA.

ANTIMICROBIANO		POSOLOGÍA	INDICACIONES
β-lactámicos Penicilinas	Amoxicilina	80-90 mg / kg / día en 3 dosis	General
	Amoxicilina Clavulánico	90 mg / kg (Ax)/ día 10 mg / kg (Cl)/ día en 3 dosis	OMA severa. Presencia de organismos productores de β- lactamasas
β-lactámicos Cefalosporinas	Cefpodoxima	10 mg / kg / día, en 2 dosis	* Paciente con reacciones alérgicas no englobadas en las de tipo I (urticaria y anafilaxis)
	Cefuroxima	30 mg / kg / día en 2 dosis	
	Ceftriaxona	50 mg / kg / día en 1 dosis (vía parenteral)	Resistencia bacteriana Vómito o intolerancia a medicación por vía oral
Macrólidos	Eritromicina	50 mg / kg / día en 3 dosis	** Paciente con reacciones alérgicas englobadas en las de tipo I (urticaria y anafilaxis)
	Azitromicina	5 mg / kg / día en 1 dosis	
	Claritromicina	15 mg / kg / día , en 2 dosis	

* Indica reacciones alérgicas a penicilinas.

** Indica reacciones alérgicas a β-lactámicos.

7.2.6. Resistencia a antibióticos.

La resistencia de neumococo a penicilina se considera un grave problema a nivel mundial. Durante los años 80 en España hubo un aumento en la incidencia de neumococos resistentes a penicilina mientras que en EEUU y el resto de los países europeos las incidencias se mantuvieron bajas. En la década de los 90, la situación se invirtió, con lo que la incidencia fue igualada y la tendencia se ha mantenido hasta hoy (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). En macrólidos, la tendencia es un incremento en el porcentaje de neumococos resistentes (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). La resistencia a eritromicina se mantiene más o menos baja entre las cepas sensibles a penicilina, pero aumenta conforme aumenta la resistencia a penicilina (Baquero F *et al* 1997).

La introducción de las vacunas conjugadas y el empleo de dosis altas de amoxicilina ha supuesto un cambio en la frecuencia de los patógenos causantes de OMA (Casey JR and Pichichero ME 2004, McEllistrem MC *et al* 2005).). Además se ha observado que los neumococos procedentes del oído medio son más resistentes a los antibióticos que los procedentes de la sangre o del tracto nasofaríngeo (Picazo JJ *et al* 2003).

El caso más preocupante lo constituyen los neumococos multirresistentes (NMR), donde la resistencia a varios antibióticos parece estar asociada a una resistencia media o elevada a la penicilina. En España, la incidencia de aislados de neumococos resistentes a tres o más grupos de antibióticos se sitúa en torno al 30-40% (Picazo JJ *et al* 2003) y en EEUU la proporción se mantiene estable en un porcentaje alrededor del 31% (Jenkins SG *et al* 2005). Un estudio canadiense constató que un elevado porcentaje de NMR son resistentes a penicilina, eritromicina y cotrimoxazol. La caracterización molecular de los NMR estudiados ha permitido hallar relación genética asociada con serotipos específicos como el 19F de Taiwán, el 14 y el 23 de España y el 9V de Francia (Zhanel GG *et al* 2006)

7.3. Analgésicos y anti-inflamatorios.

Los fármacos para controlar el dolor se emplean independientemente de la estrategia adoptada para abordar la OMA. Acetaminofeno e ibuprofeno son los más usados en caso de dolor leve o moderado ya que pueden adquirirse sin receta médica.

Acetaminofeno (paracetamol) es un analgésico no opiáceo que ejerce su acción al impedir la formación de prostaglandinas en el organismo. Presenta acción antipirética, pero no tiene un efecto anti-inflamatorio significativo. En niños, la dosis administrada se ajusta en función de la edad. En general, se administran dosis 10 mg/kg cada 4 horas o 15 mg/kg cada 6 horas. No se debe tomar más de cinco veces al día (<http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/sistemanervioso/analgesicos/analgesicos-no-opiaceos/paracetamol-acetaminofeno/>). Experimentalmente, no se ha observado sinergismo o antagonismo cuando se administra acetaminofeno conjuntamente con amoxicilina / clavulánico (Parra *et al* 2003, Ponte C *et al* 2003).

Ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido propiónico que tiene también propiedades analgésicas y antipiréticas. Su efecto anti-inflamatorio se basa en una inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas vía inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 (<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/i002.htm>).

El uso de ibuprofeno no se recomienda para niños menores de 6 meses. En niños mayores de 6 meses, la administración es oral y la dosis varía en función de la sintomatología a tratar (<http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/inflamacion/antiinflamatorios-no-esteroides-via-sistemica/ibuprofeno>):

- Para la fiebre y el dolor, se administran dosis de 5-10 mg/kg cada 8 horas hasta un máximo de 40 mg/kg.
- Para procesos inflamatorios, se administran dosis de 10 mg/kg cada 6 horas.

Los niños mayores de 12 años pueden tomar dosis de ibuprofeno cada 4-6 horas (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster/a682159-es.html>).

El uso de codeína o análogos se restringe a casos de dolor moderado – severo y bajo prescripción médica, ya que se pueden dar casos de depresión respiratoria, alteración nerviosa y molestias gastrointestinales. Benzocaína ofrece menor eficacia que acetaminofeno en pacientes mayores de 5 años (AAP & AAFP 2004).

Las gotas óticas a partir de agentes naturopáticos son comparables con anestésicos con esta presentación en pacientes mayores de 6 años. Aunque no se recomienda el empleo de gotas óticas que contengan antibióticos, esteroides o anestésicos locales en la OMA habitual (AAP & AAFP 2004), si se contempla su uso en agudizaciones de OMC con perforación y en pacientes portadores de tubos de timpanostomía (del Castillo F *et al* 2007, Murat Serin G *et al* 2007).

7.4. Otros productos.

Fármacos implicados en secretolisis y mucorregulación como el Sinupret® (un combinado de flores de sauco con varias hierbas) han sido ensayados en combinación con los antibióticos dirigidos contra formas complicadas de la OMA con resultados positivos (Gotsadze K and Gogatishvili R 2005), pero estos estudios no son concluyentes y se precisa de una mayor investigación.

Las medicinas complementarias y alternativas incluyen homeopatía, acupuntura, fitoterapia, técnicas quiroprácticas y empleo de suplementos ortomoleculares entre otras. Se recomienda precaución en su uso, ya que algunos tratamientos resultan peligrosos o interfieren con los tratamientos convencionales y por otro lado, los estudios acerca de su eficacia son insuficientes (AAP & AAFP 2004).

La administración de vitamina A con palmitato como medicamento adicional en casos de OMA minimiza el daño en la mucosa del oído medio aumentando la actividad de enzimas antioxidantes y reduciendo la formación de NO y malonildialdehído o MDA, marcadores del estrés oxidativo (Aladag I *et al* 2007). El aumento de radicales libres de oxígeno podría contribuir al establecimiento de una OMD, si el sistema de defensa antioxidante del hospedador se encuentra debilitado. Se ha sugerido el empleo de vitaminas de carácter antioxidante o enzimas como CAT, SOD y GSH-Px en el tratamiento de la OMD (Yariktas M *et al* 2004), ya que aunque no se actúa sobre el curso bacteriano, si existe cierto efecto positivo sobre el hospedador.

También parece reportar cierto beneficio el uso de sustancias volátiles como el aceite esencial de albahaca aplicado de manera directa sobre el oído (Kristinsson KG *et al* 2005).

El empleo de remedios caseros o la aplicación externa de ciclos de frío-calor podrían tener una eficacia limitada, si bien no hay estudios controlados que demuestren dicha eficacia (AAP & AAFP 2004).

7.5. Cirugía.

La alternativa quirúrgica consiste en la implantación de tubos de timpanostomía o de drenaje que reemplazan la función de la trompa de Eustaquio y facilitan la ventilación y la presión positiva de la cavidad del oído medio (Del Castillo F *et al* 2007): Sin embargo, la implantación debería restringirse a casos especiales de OM ya que presenta algunos problemas:

- la miringotomía (cirugía previa a la inserción de un tubo de timpanostomía) podría retrasar la recuperación de la membrana timpánica del proceso inflamatorio (Spratley J *et al* 2002).
- aunque se reduce la recurrencia de los episodios, si existe secreción, la otorrea a través de los tubos como consecuencia de la permanencia de los mismos en la zona (Hendley JO 2002) puede cronificarse.

La estrecha relación existente entre la trompa de Eustaquio y el tejido adenoideo sugiere el posible beneficio de la adenoidectomía en pacientes con patología recidivante, OMD y OMC. En la práctica, la adenoidectomía no debería realizarse de manera inicial a no ser que coexista una indicación para ello, como obstrucción nasal crónica o síndrome de apnea obstructiva del sueño, SAOS (J Cervera Escario *et al* 2006). La adenoidectomía exclusiva no está indicada en la OMA recurrente y se ha de valorar tras un estudio radiológico y en el caso de que se vaya a realizar una implantación de tubos (Del Castillo F *et al* 2007). En un estudio realizado en niños menores de 4 años y con tubos de drenaje implantados se ha observado que la intervención no reduce la incidencia de la OMA (Hammaren-Maimi S *et al* 2005).

No se ha visto relación entre la enfermedad amigdalar y las enfermedades del oído medio, por lo que no existe justificación científica que avale la realización de una amigdalectomía en estos procesos (J Cervera Escario *et al* 2006).

8. PREVENCIÓN DE LA OMA.

8.1. Vacunación.

La introducción de las vacunas neumocócicas ha reducido significativamente las tasas asociadas de mortalidad y morbilidad (Lee 2006).

Vacunas clásicas frente a neumococo.

Las vacunas clásicas son las que emplean polisacáridos capsulares neumocócicos. Probadas por primera vez en 1911, el empleo de la primera vacuna de 14 valencias no se aprobó en EEUU hasta 1977 (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). El número de serotipos incluidos no llegaría a 23 hasta 1983 (AlonsoDe Velasco E *et al* 1995).

Las actuales vacunas capsulares de 23 valencias contienen polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. La cobertura es del 85-90% contra los serotipos causantes de enfermedad invasora. El empleo de esta vacuna en niños, sin embargo, es fuente de controversia. La vacuna parece ser eficaz solo frente a enfermedades agudas del tracto respiratorio inferior con pronóstico grave y su eficacia en la prevención de enfermedad invasora se ha estimado en un 62% en niños entre 2 y 5 años de edad (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF).

Además, esta vacuna presenta una serie de limitaciones debido a: 1) la escasa inmunogenicidad de algunos de los serotipos incluidos (6A y 6B, 14, 19F y 23F), 2) los niveles de anticuerpos específicos para los distintos serotipos declinan sustancialmente entre los 5 y los 10 años tras la vacunación y 3) la vacuna no induce memoria inmunológica, la respuesta provocada por los antígenos es independiente de las células T. En consecuencia, la respuesta es poco significativa antes de los 2 años de edad y poco duradera entre los 2 y los 5 años.

En este sentido, la eficacia de la vacuna frente a la OMA es también limitada (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). La colonización nasofaríngea previa a la enfermedad depende del estado del portador y existe una gran influencia de la edad, llegando a alcanzar una incidencia del 50-60% a los tres años de edad, aproximadamente.

Los efectos adversos más frecuentes son locales, también con fiebre y se observan con mayor frecuencia en adultos que en niños. Los efectos adversos aumentan cuando la vacuna se administra concomitante con la de *H.influenzae* y meningococo.

Actualmente se comercializan tres tipos de vacunas de 23 serotipos en España: Neumo23® (PM-MSD) y PNU-INMUNE® (Wyeth Lederle) y la última, Pneumovax 23® (Aventis-Pasteur-MSD), que fue autorizada en febrero del 2001. Las recomendaciones para el empleo de estas vacunas se recogen en una Circular de la Agencia Española del Medicamento (nº 7/2001) y están referidas a prevenir el riesgo de enfermedad neumocócica o sus complicaciones en:

- Individuos inmunocompetentes con enfermedades crónicas (cardiovasculares, respiratorias, diabetes mellitus, cirrosis alcoholismo).
- Individuos inmunocomprometidos (asplenia anatómica o funcional, enfermedad de Hodgkin, linfoma, mieloma múltiple, insuficiencia renal, síndrome nefrótico, anemia falciforme, trasplante de órganos con inmunosupresión)
- Individuos con infección por VIH sintomática o asintomática.

Vacunas conjugadas frente a neumococo.

Las vacunas conjugadas para neumococo unen covalentemente una proteína transportadora (carrier) a los polisacáridos capsulares, aumentando la inmunogenicidad de los mismos sin que se produzca respuesta frente a dicha proteína. Aunque hay varias vacunas en fase de experimentación, solo una está autorizada tanto en los EEUU (Prevnar®, Wyeth Lederle Vaccines) como en la Unión Europea (Prevenar®, en España comercializada por Cyanamid Ibérica S.A.)

Prevenar® es una vacuna heptavalente (7VPnC) formada por los polisacáridos capsulares de los serotipos de neumococo 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, conjugados con CRM₁₉₇, una proteína mutante inofensiva de la toxina diftérica (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). La cobertura ofrecida por la vacuna respecto a los neumococos implicados en enfermedad invasora y OMA es del 84% para niños entre 2 y 23 meses, disminuyendo a un 63% en enfermedad invasora y 61% en OMA para niños entre 24 y 59 meses.

La vacuna conjugada precisa de dosis repetidas (3 dosis con un intervalo mínimo de 6 semanas / dosis, a los 2, 4 y 6 meses y una dosis de recuerdo a los 15 meses), que se administran por vía im (ACIP 2000). Se ha demostrado la eficacia de la vacuna para enfermedad neumocócica invasora, neumonía clínica y otitis media clínica, con reducción del número de episodios de OMA y OMA recurrente (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF). El empleo de la vacuna reduce las prescripciones de antibióticos (Esposito 2007) y la combinación de ambos factores disminuye el porcentaje de neumococos resistentes a penicilina que aparecen en niños con OMA (Cohen R *et al* 2006).

La vacuna conjugada genera una memoria inmunológica a edades tempranas, pero presenta una limitada cobertura (Temine 2007). La disminución de la incidencia de OMA es moderada debido a la aparición de otitis provocadas por serotipos no incluidos en la vacuna.

Los efectos adversos observados con mayor frecuencia tras inmunización son reacciones en la zona de inyección, fiebre, irritabilidad, somnolencia y sueño intranquilo. Las reacciones locales son más comunes con la 4ª dosis que con las tres primeras dosis. Se han observado también casos de convulsiones tras la inmunización (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF).

La AAP recomienda vacunación en:

- Niños menores de 24 meses (vacunación a partir de los 2 meses)
- Niños de 24 a 59 meses con alto riesgo de contraer infección invasora por neumococo (se incluyen niños con asplenia anatómica o funcional, infección con VIH, enfermedades crónicas, inmunodeficiencias, insuficiencia renal crónica y síndrome nefrótico, tratamientos inmunosupresores o riesgo de infección por neumococos resistentes a antibióticos).
- Niños mayores de 5 años y adultos con alto riesgo de contraer infección invasora por neumococo.

Otras vacunas conjugadas son la 9 valente, que incorpora serotipos 1 y 5 y aún no está comercializada, y la 11 valente, que incorpora serotipos 1, 5, 3 y 7V y que confirma una mejora en la prevención de la OMA (Prymula 2006).

Vacunas alternativas frente a neumococos.

Las vacunas alternativas emplean uno o más antígenos de proteínas neumocócicas comunes a todos los serotipos. Se busca una protección serotipo-independiente.

- La neumolisina (Ply) sola podría emplearse para conferir inmunogenicidad en futuras vacunas conjugadas. Uno de los problemas es su elevada toxicidad por lo que se busca una forma no tóxica para la producción de vacunas (Kirkham 2006).
- Combinaciones de Ply con PspA o PspC y combinaciones de PspA y PspC han demostrado un efecto sinérgico protector en ratones (Ogunniyi 2006).
- Las lipoproteínas neumocócicas PiuA y PiaA tienen un efecto protector en ratones ante enfermedades neumocócicas sistémicas (Jomaa 2006).
- La proteína transportadora poliamina D (PotD) confiere protección contra la enfermedad neumocócica invasora (Shan 2006).

8.2. Quimioprofilaxis.

La profilaxis antibiótica está indicada en OMA recurrente y se realiza administrando una sola dosis al día de 20 mg/kg de amoxicilina durante los meses de invierno. Su aplicación es controvertida, ya que la reducción en la recurrencia de la OMA en niños menores de 2 años es baja y se facilita la aparición de resistencias bacterianas (del Castillo F *et al* 2007).

La penicilina oral empleada como agente profiláctico reduce la probabilidad de infecciones neumocócicas graves en niños con anemia falciforme, pero la aparición de cepas resistentes a penicilina la descartan como medida protectora (Musher DM 2000).

El xilitol, como chicle, jarabe y pastillas ha demostrado su eficacia en prevención y tratamiento de la otitis media en varios casos (Blazek-O'Neill B 2005).

El empleo de compuestos sintéticos que impidan la adherencia del neumococo como paso previo a colonización e infección constituyen un nuevo frente de búsqueda. El oligosacárido antiadhesivo 3'sialilacto- N-neotetrosa (NE-1530) administrado intranasalmente no previene la ocurrencia de la OMA ni el transporte de las bacterias en la nasofaringe de los niños (Ukkonen P *et al* 2000).

8.3. Otros.

La utilización de probióticos en la prevención de infecciones en el aparato digestivo ha confirmado que su acción no solo se limita al impacto sobre la microbiota intestinal, si no que al mismo tiempo se ejerce una acción inmunoreguladora en el hospedador (Nomoto K 2005). Aunque los probióticos no previenen la ocurrencia de la OMA, ni modifican su duración, ni el transporte de los patógenos en niños con OMA temprana, podría existir cierta tendencia a reducir la recurrencia de infecciones respiratorias (Hatakka K *et al* 2007).

9. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA OMA.

En el estudio de las afecciones del oído medio se han empleado diversos animales como modelo experimental: ratas (Widemar L *et al* 1986, Spratley J *et al* 2002), cobayas (Liao ZS *et al* 2003), ratones (Melhus A and Ryan AF 2003), chinchillas (Weber PC and Koltai PJ 1991, Sato K *et al* 1996) y gerbos (Fulghum RS *et al* 1982, Martínez- Marín C *et al* 2005). El manejo de todos estos animales de experimentación se ajusta a protocolos regulados por una normativa y bajo la vigilancia de un comité bioético (European Community 1986), previamente según el Real Decreto 1201/2005 y ahora atendiendo a la Ley 32/2007 (BOE 8 Noviembre del 2007).

Los gerbos y las chinchillas son los animales más adecuados para estos ensayos debido a las características anatómicas y similitudes de su oído medio con el humano. El empleo del gerbo de Mongolia como modelo experimental de la OMA fue introducido por Fulghum tras su trabajo con chinchillas y las razones de su empleo en posteriores trabajos se fundamentan en:

- La estructura anatómica del oído del animal. El oído medio del gerbo está revestido de una membrana epitelial compuesta por células similares a las encontradas en la mucosa en humanos. La mayor parte de la cavidad está recubierta por células escamosas no queratinizadas. Alrededor de la trompa de Eustaquio se disponen células secretoras y células ciliadas, estas últimas en dos bandas diferenciadas por encima y por debajo de la cóclea hacia el músculo tensor y el hipotímpano, respectivamente. En la región subepitelial se disponen células fusiformes y colágeno (Chole RA and Chiu M 1985). La membrana timpánica es de gran tamaño, y la bulla del oído medio está hipertrofiada y es casi vertical a la trompa de Eustaquio (Daniel HJ et al 1982).
- La susceptibilidad del modelo a los principales agentes etiológicos de la OMA.
- La ausencia de agentes etiológicos de la OMA en la microbiota nasofaríngea común del animal.
- La disponibilidad de los animales en líneas independientes.
- La obtención de los animales a precios inferiores a los de las chinchillas por parte de los laboratorios de cría (Fulghum RS et al 1982).
- El carácter dócil y social de estos animales de manera general.

El empleo del gerbo como modelo experimental de la OMA adolece de los mismos problemas que surgen cuando se ensayan enfermedades humanas en otros modelos animales: 1) diferencias en la anatomía, respuesta inmune y farmacocinética y 2) elevado coste (Daniel HJ et al 1982).

9.1. El gerbo.

El gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) es originario del desierto de Mongolia, en Asia central. El gerbo pertenece al orden Rodentia (roedores) y dentro de este a la familia Cricetidae, estando fuertemente emparentado con el hámster. El tamaño oscila entre los 18 a 24 cm de largo, poseen ojos grandes, y un cráneo más corto y ancho que el de los ratones, con orejas grandes y cubiertas de pelo. Sus extremidades posteriores están mucho más desarrolladas que las anteriores, lo que les permite moverse a saltos erguidos sobre ellas. En su medio natural excavan túneles con múltiples cámaras en el suelo del desierto. Su vida media oscila entre los 3 y los 5 años y son sexualmente maduros a partir de los 3 meses de edad. Para su mantenimiento en cautividad se recomienda como alojamiento un terrario de 30 x 60 cm., con una altura mínima de 30 cm / pareja, con un sustrato de virutas de madera cruda y buena ventilación. A pesar de que es mejor mantenerlos en un número mínimo de 2 animales / jaula, su carácter sociable les permite convivir con un nº mayor de animales. Como alimento, se emplean preparados con mezclas de semillas o piensos especiales, siendo estos últimos mucho más equilibrados que las mezclas de semillas, con un contenido en vitaminas y minerales asegurado (<http://www.animalls.net/ARTIC21.HTML>).

II. OBJETIVOS.

Los objetivos que nos planteamos para desarrollar nuestro estudio fueron los siguientes:

- 1°. Determinar si la capacidad adherente y de formación de biopelículas por cepas de *S. pneumoniae* se correlaciona con su virulencia en el modelo de OMA experimental.
- 2°. Valorar la eficacia del tratamiento de la OMA con amoxicilina y eritromicina en administración precoz (dosis única) y tardía (5 dosis).
- 3°. Evaluar el impacto de ibuprofeno en la eficacia de los antibióticos administrados solos o en combinación con este anti-inflamatorio.
- 4°. Correlacionar la eficacia del tratamiento con la actividad in vitro de los compuestos, la farmacodinamia de los antibióticos y el estado metabólico de los microorganismos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. MICROORGANISMOS.

Tanto para los estudios *in vitro* como *in vivo*, se emplearon dos cepas de neumococo, *S. pneumoniae* FJD 60, serotipo 23 F, aislada de la sangre de un paciente con neumonía y *S. pneumoniae* AR 09164, serotipo 9V, aislada del tracto respiratorio. Ambas cepas se consideraron resistentes a penicilina ya que sus CMI_s fueron de 2 y 4 µg/mL, respectivamente.

Para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antibióticos se utilizó como control la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619.

2. ANIMALES.

El modelo experimental de OMA se desarrolló en gerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) hembras, de 8-9 semanas de edad y cuyo peso oscilaba entre los 40-50 g. Los animales fueron suministrados por el Centre d'Élevage R. Janvier (Le Genest St-Isle, Francia).

El mantenimiento de los animales incluía una alimentación adecuada y aislamiento en una unidad especial con unas condiciones adecuadas de presión y temperatura, además del establecimiento de un período de 12 horas de luz y oscuridad. Los requerimientos precisados para su cuidado se llevaron a cabo en el animalario de la Fundación Jiménez Díaz.

Todos los ensayos fueron realizados siguiendo la normativa vigente en la Ley 32/2007, según las regulaciones establecidas por la Comunidad Europea (European Community 1986) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Este proyecto contó con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz UTE.

3. FÁRMACOS.

3.1. UTILIZACIÓN *IN VITRO*.

Se emplearon trihidrato de amoxicilina (GlaxoSmithKline, Worthing, Inglaterra) y eritromicina (Sigma, St. Louis, EEUU).

Para los ensayos realizados con ibuprofeno, se empleó una presentación del producto soluble en agua, sal sódica de ibuprofeno (Sigma).

3.2. UTILIZACIÓN *IN VIVO*.

Para procedimientos invasivos, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Ketolar, Parke Davis, Barcelona, España) y xilazina (Rompún, Bayer, Leverkusen, Alemania). La mezcla se administró por vía intramuscular (Barry B and Muffat-Joly M, 1999)

En el tratamiento con antibióticos se emplearon, según las experiencias correspondientes, viales comerciales de amoxicilina (Clamoxyl, GlaxoSmithKline S.A., Madrid, España) y lactobionato de eritromicina (Pantomicina, Abbot Laboratories S.A., Madrid, España) previamente reconstituidos en agua destilada apirógena estéril y diluidos hasta alcanzar las concentraciones deseadas. La administración de estos fármacos fue por vía subcutánea (sc).

En los estudios con ibuprofeno, se empleó un jarabe de ibuprofeno (Junifén suspensión, Boots Healthcare International, Nottingham, Reino Unido). La administración fue por vía oral (or), a través de una sonda esofágica (Harvard Apparatus., Maryland, EEUU).

4. ESTUDIOS *IN VITRO*.

4.1. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD.

4.1.1. Determinación de la CMI.

La CMI se determinó por el método de microdilución siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2006).

Como inóculo se utilizó una suspensión en caldo Mueller-Hinton II (MHB II, Becton, Dickinson and Company, Maryland, EEUU), preparado a partir de una placa de agar triptosa soja con 5% de sangre de cordero (TSS, Biomerieux España S.A., Madrid, España) incubada durante 18 horas a 35 ° y 5% de CO₂. Para determinar recuentos bacterianos, se sembraron en placas TSS diluciones del inóculo de cada cepa por duplicado.

Los antibióticos se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito por los NCCLS (NCCLS, 2003) y fueron alicuotados, manteniéndose a –70 ° C hasta el momento de su empleo. Todas las diluciones se realizaron en caldo completo (MHB II -S), preparado a partir de MHB II al cual se le añadió sangre lacada de caballo al 4% (Biomerieux España S.A., Madrid, España) conforme el protocolo descrito por los NCCLS (NCCLS, 2003). Los rangos de concentraciones ensayados para cada producto fueron:

- Para los ensayos con amoxicilina: 0,0035 – 8 µg / ml.
- Para los ensayos con eritromicina: 0,0035 – 8 µg / ml.
- Para ibuprofeno: 4 - 4096 µg / ml.

La lectura de la CMI se realizó a las 22 horas de incubación de la placa microtiter. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado para cada cepa de estudio.

Por otro lado se determinó la CMI de cada antibiótico para 64 aislados de la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60, 32 de ellos procedentes del exudado del oído medio de animales tratados con amoxicilina y otros 32 extraídos de animales tratados con eritromicina, en ambos casos con cinco dosis de 5 mg/kg de cada antibiótico administrado a las 18, 21, 24, 27 y 30 horas post inoculación (p.i.) y sin erradicación bacteriana completa. Así mismo se determinó también la CMI de 8 aislados de la misma cepa, procedentes de animales no tratados (animales control). La determinación se realizó empleando el método de E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia).

4.1.2. Estudios de sinergismo antimicrobiano frente a la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Se estudiaron los efectos de asociaciones de ibuprofeno con amoxicilina o eritromicina a diferentes concentraciones sobre el crecimiento bacteriano mediante la técnica en damero en placas microtiter.

Tanto el inóculo como los fármacos empleados en el ensayo, se prepararon siguiendo el mismo protocolo que el referido anteriormente para la determinación de la CMI de la cepa. El rango de concentraciones a estudiar se estableció entre 4 – 0.12 µg/ ml para amoxicilina, 0,5 – 0,015 µg/ ml para eritromicina y 2048 – 64 µg/ ml para ibuprofeno.

La lectura de la placa se realizó transcurridas 22 horas de incubación. El ensayo se realizó por triplicado para cada asociación.

Para calcular los índices de la concentración fraccional inhibitoria (FIC) para cada fármaco (FIC_{PRODUCTO} o FIC_P) se consideraron los pocillos con la concentración más baja (CMI) de ibuprofeno o antibiótico donde la combinación inhibía el crecimiento bacteriano. El FIC_{TOTAL} (FIC_T) se calculó según la fórmula:

$$FIC_T = \frac{\text{CMI ibuprofeno + antibiótico}}{\text{CMI ibuprofeno}} + \frac{\text{CMI ibuprofeno + antibiótico}}{\text{CMI antibiótico}}$$

En función del valor obtenido del FIC_T se establecieron las definiciones de a) sinergia: FIC_T < 0,5, b) indiferencia: FIC_T, 0,5 – 4 y c) antagonismo: FIC_T > 4 (Marco F *et al* 2000).

4.1.3. Curvas de mortalidad de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

4.1.3.1. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina y eritromicina en diferentes condiciones experimentales.

Con objeto de evaluar *in vitro* el impacto de amoxicilina o eritromicina en condiciones experimentales distintas, se efectuaron curvas de mortalidad según los protocolos descritos por los NCCLS (NCCLS, 1999). Se utilizaron dos medios, uno rico en nutrientes, caldo Todd-Hewitt (THB, Difco, Becton Dickinson and Company, Maryland, EEUU) y otro sin nutrientes, Phosphate Buffer Saline (PBS, Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

Se estudiaron tres condiciones experimentales:

- En la primera, se empleó como inóculo una suspensión preparada en THB a partir de una placa crecida durante 18 horas. El inóculo se añadió a tubos que contenían THB o PBS, con y sin antibiótico.
- En la segunda, se empleó un inóculo preparado a partir de un cultivo crecido en THB durante 3 horas aproximadamente (fase exponencial I). El inóculo se sembró en tubos con THB o PBS, con y sin antibiótico.
- En la tercera se empleó un inóculo también crecido en THB durante 2 horas al que se le añadió directamente el antibiótico (fase exponencial II).

En los tres casos el inóculo inicial fue de aproximadamente 10^6 ufc/ml.

Amoxicilina y eritromicina se ensayaron a una concentración de 5 µg/ml y 0,6 µg/ml respectivamente, concentraciones que se correspondían con 5 x CMI de estos antibióticos para la cepa de estudio. El volumen final en cada tubo fue de 10 ml. Todos los tubos se incubaron en un baño a 36 ° C, con agitación suave.

Se realizaron recuentos bacterianos a las 0 horas (determinación del inóculo) y a las 3 y 6 horas de incubación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.1.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina y eritromicina en presencia de ibuprofeno.

Se estudió la actividad bactericida de amoxicilina y eritromicina solas o asociadas a ibuprofeno a lo largo del tiempo sobre un inóculo obtenido en la condición de fase exponencial I, previamente expuesta en el apartado anterior. Amoxicilina y eritromicina se ensayaron a concentraciones de 5 y 0,6 µg / ml, respectivamente. Ibuprofeno se ensayó a dos concentraciones, 4 y 128 µg / ml.

En el estudio de cada antibiótico se consideraron 6 tubos de curva: a) control, b) amoxicilina o eritromicina, c) ibuprofeno 128 µg/ ml, d) ibuprofeno 4 µg/ ml, e) amoxicilina o eritromicina e ibuprofeno 128 µg/ ml y f) amoxicilina o eritromicina e ibuprofeno 4 µg/ ml. El volumen final en cada tubo fue de 10 ml. Ibuprofeno, antibiótico e inóculo se añadieron a cada tubo, y por este orden, en un volumen de 100 µl cada uno. En los tubos sin alguno de los fármacos se completó el volumen hasta 10 ml con THB. Todos los tubos se incubaron en el baño a 36 °C y con agitación suave.

Se realizaron recuentos bacterianos a las 0 horas para determinar el inóculo inicial y a las 3 y 6 horas de incubación. La experiencia se realizó por triplicado para cada antibiótico y/o combinación.

4.2. CAPACIDAD DE ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA SOBRE MATERIAL ABIÓTICO.

4.2.1. Capacidad de adherencia.

4.2.1.1. Establecimiento experimental de adherencia *in vitro*.

Se estudió la adherencia de *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164 en placas microtiter de poliestireno con fondo plano no tratadas (Grenier Bio-one, Frickenhausen, Alemania). El inóculo se preparó en MHB II a partir de una placa crecida durante 18 horas e incubadas en estufa a 35 ° C y 5 % de CO₂, se diluyó al 1/10 y finalmente, se transfirió a una placa microtiter un volumen de 200 µl/pocillo con el objeto de partir de 10⁷ ufc/ mL. Para determinación del inóculo inicial se realizaron diluciones seriadas y siembra. Para recuperar las bacterias adheridas se emplearon dos técnicas distintas: 1) rascado y 2) sonicación.

Para la técnica de rascado, la placa microtiter se incubó durante 2 horas en estufa a 35 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, se eliminó el contenido de los pocillos mediante el volcado de la placa. Seguidamente, se lavaron los pocillos 10 veces con solución salina estéril (SSE) y el fondo de cada uno fue raspado con una varilla con objeto de despegar las bacterias adheridas al material plástico. El contenido, junto con la varilla, se resuspendió en 200 µl de MHB II. La varilla se agitó enérgicamente para desprender el material que pudiera haberse adherido a ella durante el proceso de rascado. La suspensión se pipeteó x 10 veces con el fin de disgregar mecánicamente los conglomerados bacterianos.

Para la técnica de sonicación, la placa, se incubó a 35 °C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, se vaciaron y se lavaron los pocillos 10 veces con SSE. A continuación, la placa fue procesada en un sonicador (Bandelin Sonorex TK 2, Schaltel GMBH, Morffelden – Waldorff, Alemania) durante 2 minutos y el contenido de los pocillos resuspendido en un volumen de 200 µl de MHB II y pipeteado x 10 veces para disgregar conglomerados bacterianos.

Tras el rascado o la sonicación de los pocillos se realizaron diluciones de la suspensión obtenida y se sembraron en TSS para obtención de recuentos. Se determinó el nº de ufc adheridas / millón de bacterias respecto al inóculo inicial. Todos los experimentos se efectuaron 10 veces para cada técnica.

4.2.1.2. Impacto del ibuprofeno en la capacidad adherente de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Se estudió el impacto del ibuprofeno, sobre la capacidad adherente de la cepa en placas de poliestireno de fondo plano siguiendo las dos técnicas previamente descritas en el apartado anterior. Ibuprofeno se ensayó a dos concentraciones, de 4 y 128 µg/ml. Todas las diluciones se hicieron en MHB II.

Se determinó el número de ufc adheridas / millón de bacterias respecto al inóculo inicial y se compararon los resultados de adherencia obtenidos en pocillos sin ibuprofeno (controles) respecto a los obtenidos en presencia de ibuprofeno. El ensayo se realizó 10 veces para cada técnica.

4.2.1.3. Impacto de la asociación de ibuprofeno con antibióticos sobre la capacidad adherente de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60

Se estudió la variación en la capacidad adherente de la bacteria a placas de poliestireno en presencia de amoxicilina o eritromicina solas o combinadas con ibuprofeno siguiendo la técnica de rascado descrita en el apartado **4.2.1.1.**

Cada antibiótico se ensayó a dos concentraciones distintas, 0,25 y 0,12 µg/ml de amoxicilina y 0,03 y 0,015 µg/ml de eritromicina (correspondientes con un 1/4 y 1/8 de la CMI). Ibuprofeno se ensayó a una única concentración de 128 µg/ml.

Nuevamente, se determinó el número de ufc adheridas / millón de bacterias respecto al inóculo inicial para cada fármaco y asociación y se compararon los resultados entre si y respecto al control. Se realizaron 10 ensayos para cada concentración de antibiótico.

4.2.2. Formación de biopelículas.

4.2.2.1. Establecimiento experimental de la biopelícula.

Se estudió la capacidad de cada cepa bacteriana para formar biopelículas sobre placas microtiter de poliestireno con fondo plano a las 16 y 24 horas de incubación. Para ello, se empleó una técnica colorimétrica con cristal violeta (Naves P *et al* 2008).

Se utilizó un inóculo en fase exponencial preparado a partir de un cultivo crecido durante 3 horas en MHB II. En cada pocillo de la placa microtiter, se sembraron 10 µl de inóculo en un volumen de 200 µl de MHB II, de tal forma que el inóculo de partida fue de aproximadamente, 5×10^6 ufc/mL. También se procesaron pocillos con medio de cultivo sin bacteria (controles).

La placa se incubó durante 16 o 24 horas, según el caso, a 35° C y 5% de CO₂. Transcurridos estos tiempos, se leyó la densidad óptica (D.O.) a 630 nm con un lector de placas (DYNEX Technologies Inc, Vancouver, Canadá). A continuación, el contenido de cada pocillo fue eliminado por aspiración para deshechar las bacterias planctónicas y se sometió a la placa a una tinción con violeta de genciana al 1% (Panreac Química Sau,

Barcelona, España). Se añadieron 200 μ l del colorante en cada pocillo y se mantuvo la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se eliminó el contenido de los pocillos por aspiración y estos se lavaron con agua apirógena estéril 4 veces con un volumen de 300 μ l/pocillo. Tanto la aspiración como los lavados fueron realizados en un lavador de placas automático (DAS, Roma, Italia). La placa se dejó secar al aire durante media hora y finalmente se añadió un volumen de etanol absoluto en cada pocillo igual al de partida (200 μ l). Tras el tratamiento, se leyó la D.O. a 570 nm, con el objeto de determinar el material adherido.

Se determinaron las medias y D.E. de las D.O. de la turbidez total a 630 nm, así como la D.O. a 570 nm a las 16 y 24 horas de incubación. La capacidad de formación de biopelícula se calculó mediante la fórmula

$$B = \text{Valor medio de } (C_{B\ 570} - C_{W\ 570})$$

donde $C_{B\ 570}$ es la D.O. a 570 nm de cada pocillo con bacteria y $C_{W\ 570}$ es la media de la D.O. a 570 nm de todos los controles sin bacteria.

Ambos ensayos se realizaron por cuadruplicado, estudiándose 16 pocillos por experiencia y recogiendo un total de 64 observaciones.

Se efectuaron recuentos de bacterias planctónicas y adheridas a las 16 y 24 horas de incubación con el objeto de estudiar la viabilidad de cada cepa bacteriana en ambas condiciones. Para determinar recuentos de bacterias planctónicas se realizaron diluciones seriadas del contenido del pocillo. Las bacterias adheridas se obtuvieron por sonicación de la placa durante 2 minutos y resuspensión en MHB II. Nuevamente, se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas TSS. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.2.2. Impacto del ibuprofeno sobre la formación de biopelícula de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Se estudió el impacto del ibuprofeno sobre la capacidad de la bacteria para formar biopelícula a las 24 horas. Para ello, ibuprofeno se estudió en un rango de concentraciones establecido entre 0,25 – 128 μ g/ml. La técnica se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado anterior y también se realizó por cuadruplicado, estudiándose un total de 16 pocillos para cada concentración de ibuprofeno.

4.2.2.3. Visualización de la biopelícula formada por la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 mediante microscopía confocal sin y con 128 µg/mL de ibuprofeno.

Siguiendo el protocolo para el establecimiento de biopelícula a las 24 horas descrito en el apartado 4.2.2.1, se prepararon muestras de la biopelícula formada por la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 en MHB II en ausencia y presencia de 128 µg/ mL de ibuprofeno para su observación empleando microscopía confocal. Para ello, se utilizaron cubetas con fondo de vidrio (Lab Tek® II Chamber #1.5 German Coverglass System, Nalge Nunc Internacional Corp, Naperville, EEUU).

A las 24 horas, se extrajo el medio de cultivo del pocillo y la cámara se dejó secar durante 20 min a 37 °C. A continuación, se fijó la biopelícula con metanol (Panreac) durante 2 minutos y después se lavó con SSE durante 1 minuto. Una vez procesada y lavada, la biopelícula se tiñó con 200 µL de naranja de acridina (Becton Dickinson). La cámara se incubó en la oscuridad y a 30 °C durante 10 minutos y transcurrido este tiempo, se eliminó el colorante y se lavó su exceso con SFE durante 1 minuto.

Para visualizar la muestra se empleó un microscopio confocal Leica DCS-SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). La cubeta se colocó directamente sobre el microscopio confocal y la visualización se realizó con el objetivo de 40 × de inmersión en H₂O. La muestra se excitó a 476 nm y el espectro de emisión se estableció en 535 nm. Se registraron 9 campos al azar y se aplicó un zoom del 4%.

4.2.3. Análisis estadístico.

El test de Mann- Withney se utilizó para hallar las diferencias en la capacidad de adherencia de cada una de las cepas estudiadas de *S. pneumoniae*, FJD 60 y AR 09164. El tamaño de la muestra (N) fue de 10 observaciones para cada cepa. El test de Kruskal-Wallis se aplicó para determinar las diferencias entre el impacto de diferentes concentraciones de ibuprofeno solo o combinado con amoxicilina o eritromicina sobre la capacidad adherente de la cepa de *S. pneumoniae* FJD y N fue de 10 observaciones para cada concentración de fármaco o combinación.

Para determinar la diferente capacidad de cada cepa para formar biopelícula y hallar las diferencias en la biopelícula tras 16 y 24 horas de incubación se aplicó el test de la t de Student (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>). N fue de 64 observaciones para cada cepa. Nuevamente, se aplicó el test de Student para evaluar el efecto de varias concentraciones de ibuprofeno sobre la formación de biopelícula, siendo N de 16 observaciones para cada concentración de fármaco.

5. ESTUDIOS *IN VIVO*.

5.1. MODELO EXPERIMENTAL DE OMA.

5.1.1. Marcaje y depilado del sujeto experimental.

El día previo a la inoculación (día 0) se marcó a los animales con ácido pícrico según un código preestablecido en nuestro laboratorio para su correcta identificación. También se les afeitó la zona que rodea el pabellón auricular con objeto de permitir buena visualización y accesibilidad al oído del animal. Para ello, se anestesió a los animales con una mezcla de ketamina (30 mg/kg) y xilacina (9 mg/kg).

5.1.2. Preparación del inóculo.

Las bacterias se mantuvieron congeladas a -70°C hasta el día del ensayo. El día 1 del experimento, se descongelaron y se sembraron en caldo infusión corazón-cerebro (BBH, Becton Dickinson) previamente calentado en estufa y enriquecido con un 5% de suero de caballo (Biomerieux). Los cultivos se incubaron a 35°C y un 5% de CO_2 durante un tiempo aproximado de 4 horas, hasta que alcanzaron una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland ($\approx 10^8$ ufc / ml). Se efectuaron diluciones seriadas de los inóculos correspondientes a cada cepa bacteriana y recuentos de colonias para determinar el número de bacterias viables que se inocularon en los oídos de los animales.

5.1.3. Inoculación de la bacteria en el oído medio.

Los animales fueron previamente anestesiados con una mezcla de ketamina (50 mg/kg) y xilacina (13 mg/kg) y, a continuación, inoculados bilateralmente con 20 µl del inóculo correspondiente por inyección en la bulla del oído medio. La inoculación se realizó con ayuda de un microscopio quirúrgico, de tal forma que la membrana timpánica permanecía intacta, sin desgarros, comprobándose posteriormente la normalidad la misma. Una vez realizada la inoculación de los animales, estos fueron pesados.

5.1.4. Evaluación de los animales y recogida de datos experimentales.

Con el objeto de determinar experimentalmente la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo, se evaluaron los distintos parámetros a las horas 5, 18, 21, 48 y 67 tras la inoculación con aproximadamente 10^6 ufc/oído de la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60.

Tanto para los estudios de patogenicidad con las dos cepas de *S. pneumoniae*, FJD 60 y AR 09164, como para los estudios de eficacia con la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60, la evaluación de los parámetros se realizó los días 2 y 3 del experimento, es decir, a las 24 y 48 horas p.i., bacteriana, respectivamente.

A las 24 horas p.i. se recogieron los datos referidos a los siguientes parámetros:

- 1- Aspecto general de los animales. Se observaron las variaciones en el pelaje (normal, apelmazado, erizado, etc.).
- 2- Comportamiento. Se valoró la actividad de cada animal (normal o aletargado), así como la inclinación de la cabeza o si este corría en círculos como consecuencia de laberintitis.
- 3- Presencia de otorrea (efusión de líquido desde el oído medio hacia el exterior debida a la perforación de la membrana timpánica). Se observó mediante examen del oído externo.

A las 48 h p.i. se evaluaron:

- 1- La variación en el peso experimentada por los animales, a partir de los datos recogidos el día de la inoculación (día 1) y los nuevos datos extraídos de una segunda pesada a las 48 h p.i. Esta se expresó como porcentaje de pérdida de peso.
- 2- El aspecto de la membrana timpánica. Con ayuda de un microscopio quirúrgico se observaron variaciones en:

- Color: Amarilla-rosada en animales sanos y desde el gris hasta el amarillo – marrón oscuro en animales infectados.

- Textura: La inflamación otorga un aspecto granuloso a la membrana.

- Espesor: Informa del grado de opacidad de la membrana.

- Disposición: La membrana es cóncava y ligeramente retraída en condiciones normales, y aplanada, convexa o abultada cuando existe inflamación.

- Grado de inflamación: Variable, desde una vasodilatación discreta, pasando por un estado hiperémico, hasta una inflamación aguda con hemorragia intratimpánica.

En función de los datos observados, se consideró la presencia de OMA cuando se encontró perforación y/o signos importantes de inflamación de la membrana timpánica, otitis media intermedia (OMI) cuando se hallaron signos de inflamación menos marcados que en el caso de OMA y OMD cuando no hubo presencia de inflamación, pero sí niveles hidroaéreos observables.

- 3- Examen de las muestras extraídas del oído medio. Se procedió a la extracción del exudado del oído medio, previo lavado con 20 µl de SSE inyectada a través de la membrana timpánica con una aguja de 0,33 mm.

Para determinar los recuentos bacterianos, se sembraron alícuotas de 5 µl de cada muestra, directamente en placas TSS, que se incubaron a 35 °C y con 5% de CO₂ durante 24 h. Los recuentos bacterianos se expresaron como Log₁₀ ufc/20 µl y el límite de detección se estableció en 4 ufc/20 µl (0,60 Log₁₀ ufc/20 µL).

Además, se valoró la presencia de PMNs en la muestra, siempre que el volumen de extracción fue suficiente. Para ello, se extendieron 3 µl de la muestra sobre un porta en un área de 6 cm². La fijación se realizó con metanol y la tinción fue con safranina; tras lo cual la preparación quedó lista para ser observada al microscopio con el objetivo x 1000. Las valoraciones se llevaron a cabo efectuando un recuento de PMN en 20 campos / preparación (media ± D.E.).

5.2. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.

5.2.1. Determinación de los niveles del antibiótico en suero.

Los niveles séricos de cada antibiótico se determinaron en animales sanos después de inyectarles 5 mg / kg de amoxicilina o eritromicina por vía sc. Se extrajeron muestras de sangre para realizar determinaciones a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras la administración del antibiótico, empleando 6 gerbos para cada tiempo de extracción. La extracción se realizó rápidamente mediante la técnica de punción cardiaca tras sacrificar a los animales. La sangre se recogió en viales y fue centrifugada (Microfuge 11, Beckman) a 13000 r.p.m. durante 5 minutos para obtener el suero, que se alicuotó y congeló a -70° C.

Se elaboró una recta patrón para cada antibiótico a partir de concentraciones conocidas de amoxicilina o eritromicina previamente pesadas, alicuotadas y conservadas a -70° C. Las concentraciones estudiadas para amoxicilina o eritromicina fueron de 0,12, 0,25, 0,5, 1 y 2 µg/mL y las diluciones se realizaron en un pool de suero preparado a partir de animales sanos. Con el objeto de corregir las posibles variaciones derivadas de nuestro experimento, se prepararon como control interno, concentraciones de 0,30 µg/mL de cada antibiótico

La determinación de las concentraciones séricas de cada antibiótico se realizó mediante un método biológico con *Kocuria rizophila* (anteriormente *Micrococcus luteus*) ATCC 9341, extrapolando los datos obtenidos a una recta de regresión obtenida con concentraciones de antibiótico conocidas.

5.2.2. Determinación de los niveles de antibiótico en las muestras de exudado del oído medio previa inoculación de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Se calcularon las concentraciones alcanzadas por cada antibiótico en el exudado del oído medio de animales que habían sido inoculados bilateralmente con la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60, empleando el modelo experimental descrito en el apartado 5.2.1. Amoxicilina o eritromicina fueron administradas en una dosis de 5 mg / kg por vía sc. Se estudiaron un grupo de animales que recibieron antibiótico a las 5 h p.i y otro grupo que recibió el antibiótico a las 21 h p.i.

Las muestras del oído medio se obtuvieron 60, 90 y 120 minutos después de administrar el tratamiento, a través de la membrana timpánica y usando una aguja de 0,33 mm, sin lavado previo. Se emplearon 10 animales (20 oídos) para cada tiempo de extracción. A partir de las alícuotas obtenidas de cada muestra con volúmenes > 1 µl de exudado se elaboró un “pool” para determinar la concentración de antibiótico.

Se elaboró una recta patrón para cada antibiótico, esta vez en buffer fosfato 0,1 M a pH 6,0. Las concentraciones preparadas de amoxicilina o eritromicina para elaborar la recta patrón fueron de 0,06, 0,12, 0,25, 0,5 1, 2 y 4 µg/mL. Se incluyeron controles internos para cada antibiótico de 0,6 µg/mL.

La determinación de las concentraciones alcanzadas por cada antibiótico en el oído medio se realizó, nuevamente, utilizando un método biológico con *K. rizophila* ATCC 9341. Los resultados obtenidos se extrapolaron a la recta de regresión obtenida mediante una curva patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de cada antibiótico. Para ambos casos, la variabilidad entre las muestras individuales fue <10%. El análisis farmacocinético se realizó con ayuda del programa WinNonlin Pro.

5.3. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS E IBUPROFENO Y ESTUDIOS DE EFICACIA PARA LA CEPA *S. pneumoniae* FJD 60.

Se valoró la eficacia de amoxicilina o eritromicina solas o asociadas a ibuprofeno. El estudio se realizó empleando cada antibiótico a una dosis de 5 mg/kg. Los dos antibióticos fueron previamente reconstituidos en agua apirógena estéril, diluidos a la concentración deseada y administrados por vía sc. Los grupos que no fueron tratados con antibiótico recibieron agua apirógena estéril también por vía sc.

El ibuprofeno se administró por vía or mediante una sonda en dosis de 2,5 ó 7,5 mg / kg y los grupos que no fueron tratados con ibuprofeno recibieron agua apirógena estéril por vía or.

Para cada antibiótico ensayado, se establecieron 6 grupos de 10 animales:

- Grupo A: Control. No recibió ni antibiótico ni ibuprofeno.
- Grupo B: Tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno.
- Grupo C: Tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno.
- Grupo D: Tratado con 5 mg/kg del antibiótico.
- Grupo E: Tratado con 5 mg/kg del antibiótico y 2,5 mg/kg de ibuprofeno.
- Grupo F: Tratado con 5 mg/kg del antibiótico y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

Se realizaron dos tipos de experimento:

- En el primero, el antibiótico, el ibuprofeno o ambos fueron administrados en una sola dosis a las 5 horas p.i. y se consideró como tratamiento precoz.
- En el segundo, el antibiótico, el ibuprofeno o ambos fueron administrados en 5 dosis a las 18, 21, 24, 27 y 30 horas p.i. y se consideró como tratamiento tardío.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En el estudio estadístico se aplicaron determinadas pruebas para el análisis de las variables cualitativas (oídos con OMA, OMI y OMD, otorrea y con cultivo positivo) y cuantitativas (pérdida de peso, recuentos bacterianos y recuentos de PMN).

5.4.1. Análisis de variables cualitativas.

En cada grupo de estudio, se calcularon los porcentajes correspondientes al nº de casos de OMA, OMI y OMD, otorrea y oídos con cultivos positivos respecto del total de oídos. Se empleó la prueba del Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher para analizar las tres variables en los distintos grupos. Se comparó la homogeneidad de la tasa de erradicación entre los grupos mediante la prueba de Breslow-Day. La corrección de Bonferroni se empleó para corregir el error global en la comparación de las tasas de erradicación.

5.4.2. Análisis de variables cuantitativas.

Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de cada animal, obteniéndose una media \pm D.E. por grupo. Los recuentos bacterianos se expresaron en Log₁₀ ufc / 20 µl de líquido de lavado del oído medio, incluyéndose las muestras negativas, las cuales fueron llevadas al valor del límite de detección, resultando esto útil para el cálculo de las medias. Se empleó el test de Mann-Whitney para comparar por parejas los valores del porcentaje de pérdida de peso, los recuentos bacterianos y los recuentos de PMNs en los diferentes grupos. El test de Kruskal-Wallis se aplicó para comparar estas variables cuantitativas en todos los grupos a la vez.

IV. RESULTADOS.

1. ESTUDIOS *IN VITRO*.

1.1. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD.

1.1.1. Determinación de la CMI.

Para la cepa de *S. pneumoniae* AR 09164, los valores de CMI obtenidos con amoxicilina y eritromicina fueron, respectivamente, de 8 y 0,12 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en los tres ensayos realizados.

Para la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60, los valores de CMI obtenidos con amoxicilina, eritromicina e ibuprofeno fueron, respectivamente, de 1, 0,12 y 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en los tres ensayos realizados.

Los valores de CMI de amoxicilina y eritromicina para los aislados de *S. pneumoniae* FJD 60, procedentes de exudados de oído medio tanto de animales del grupo control como de los grupos tratados con antibiótico, permanecieron en 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 0,12 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente.

1.1.2. Sinergismo antimicrobiano frente a la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

En la tabla 1 se recogen las CMIs de ibuprofeno y amoxicilina y los valores de los índices FIC_P y FIC_T obtenidos por la combinación de ibuprofeno + amoxicilina con un inóculo de $5,79 \pm 0,17 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Tabla 1. Índices parciales y totales (FIC_P y FIC_T) obtenidos en los isobologramas ibuprofeno + amoxicilina.

Ensayo	Fármacos	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Ibuprofeno + Amoxicilina			
			CMI	FIC_P	FIC_T	Comportamiento
1º	Ibuprofeno	1024	512	0,5	1	Indiferente
	Amoxicilina	1	0,5	0,5		
2º	Ibuprofeno	1024	32	0,031	1,03	Indiferente
	Amoxicilina	1	1	1		
3º	Ibuprofeno	1024	32	0,031	1,03	Indiferente
	Amoxicilina	1	1	1		

Los resultados obtenidos mostraron que el efecto de la combinación ibuprofeno + amoxicilina fue indiferente para la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 en los tres ensayos realizados ($FIC_T = 1,02 \pm 0,02$).

En la tabla 2 se recogen las CMIs de ibuprofeno y eritromicina, así como los valores de los índices FIC_P y FIC_t obtenidos por la combinación de ibuprofeno + eritromicina con un inóculo de $5,92 \pm 0,09 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Tabla 2. Índices parciales y totales (FIC_P y FIC_T) obtenidos en los isobologramas ibuprofeno + eritromicina.

Ensayo	Fármacos	CMI (µg/mL)	Ibuprofeno + Eritromicina			
			CMI	FIC _P	FIC _T	Comportamiento
1°	Ibuprofeno	1024	128	0,062	0,56	Indiferente
	Eritromicina	0,12	0,06	0,5		
2°	Ibuprofeno	1024	512	0,5	1	Indiferente
	Eritromicina	0,06	0,03	0,5		
3°	Ibuprofeno	1024	32	0,031	1,03	Indiferente
	Eritromicina	0,12	0,12	1		

El efecto de la combinación eritromicina + ibuprofeno también fue indiferente para la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 en los tres ensayos realizados (FIC_T = 0,86 ± 0,26).

1.1.3. Curvas de mortalidad de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

1.1.3.1. Evaluación de la actividad bactericida de amoxicilina en distintas condiciones experimentales.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos utilizando un inóculo en suspensión de 6,06 ± 0,09 Log₁₀ ufc/mL, utilizando THB y PBS, en presencia y ausencia de amoxicilina.

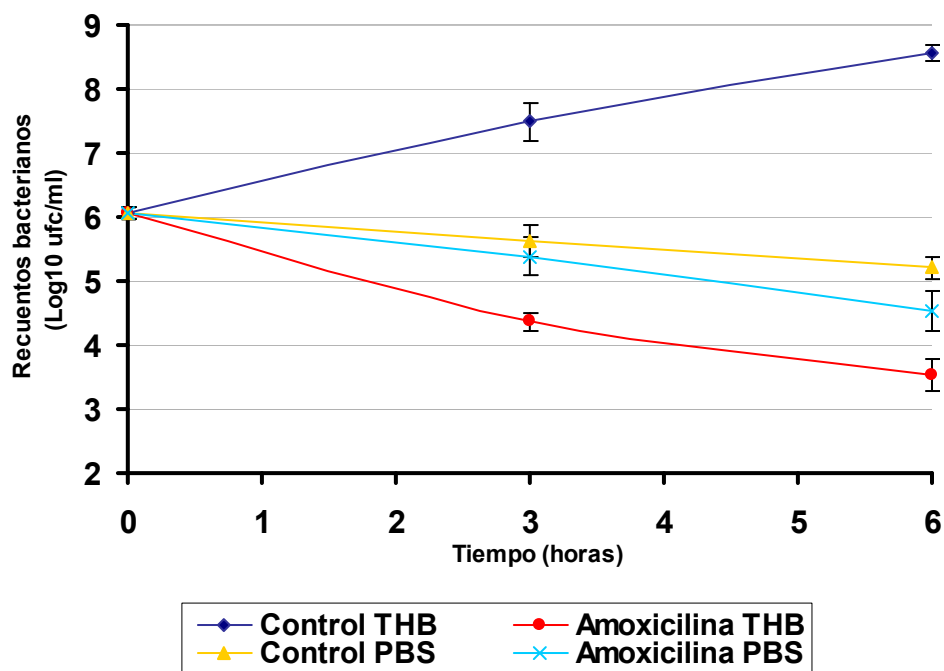


Figura 1. Recuentos bacterianos de un inóculo en suspensión de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a 5 µg/mL de amoxicilina en THB y PBS.

Se observó una reducción espontánea de los recuentos bacterianos en PBS a las 6 horas que fue de $0,85 \pm 0,26 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. A ese mismo tiempo, la presencia de amoxicilina en PBS disminuyó ligeramente los recuentos bacterianos cuando se comparó con los obtenidos en PBS sin antibiótico, siendo la diferencia de $0,69 \pm 0,19 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Por otro lado, amoxicilina en THB redujo los recuentos bacterianos a las 6 horas en $2,53 \pm 0,17 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ respecto al inóculo inicial, siendo la diferencia con el control en ese momento de $5,03 \pm 0,17 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos utilizando un inóculo en fase exponencial de $6,33 \pm 0,03 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ que se añadía a los tubos con antibiótico (fase exponencial I), ensayado tanto en THB como en PBS, en presencia y ausencia de amoxicilina.

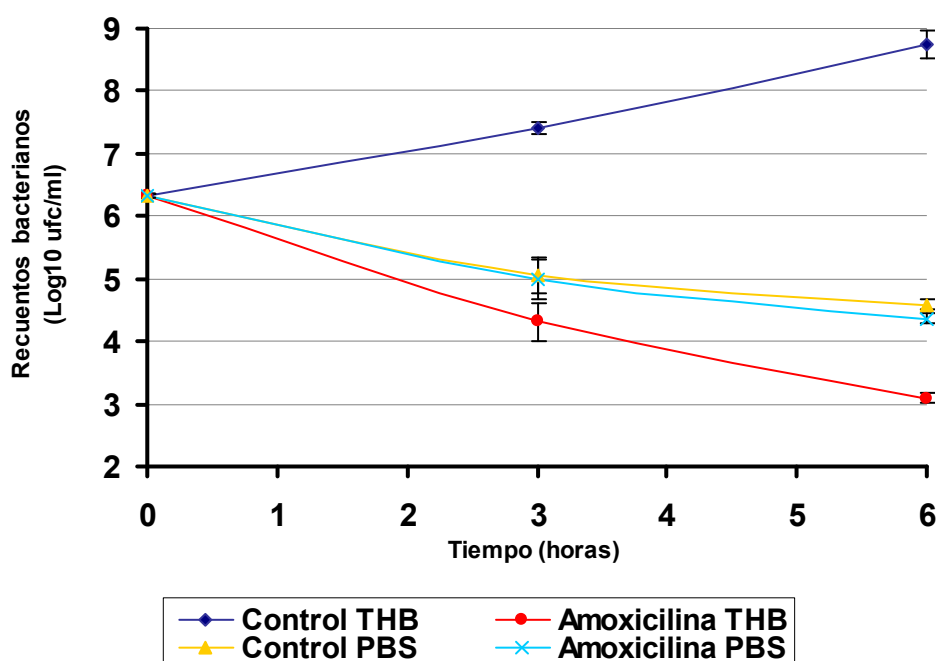


Figura 2. Recuentos bacterianos de un inóculo en fase exponencial I de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a 5 µg/mL de amoxicilina en THB y PBS

El número de ufc experimentó una reducción espontánea en PBS a las 6 horas que fue de $1,75 \pm 0,11 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. No hubo diferencias en ese momento cuando se comparó la reducción de los recuentos bacterianos en PBS con amoxicilina frente al PBS control, siendo la diferencia de $0,21 \pm 0,15 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

La reducción en los recuentos bacterianos con amoxicilina en THB a las 6 horas fue de $3,24 \pm 0,12 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. respecto al inóculo inicial. La diferencia con el control a ese tiempo fue de $5,66 \pm 0,27 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Los resultados obtenidos de ambos experimentos (inóculos en suspensión y fase exponencial I) demostraron que:

- 1- La eficacia de amoxicilina disminuía en PBS respecto al THB con ambos inóculos.
- 2- La mayor reducción en los recuentos bacterianos se consiguió en THB, tanto si el inóculo se añadió en suspensión como en fase exponencial, aunque esta reducción fue mayor con el inóculo de fase exponencial.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos en THB con un inóculo en fase exponencial de $5,55 \pm 0,14 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ al que se le añadió amoxicilina tras 2 horas de crecimiento (fase exponencial II). Los resultados se muestran comparativamente con un inóculo en fase exponencial que se añadió a un tubo con THB y amoxicilina (fase exponencial I).

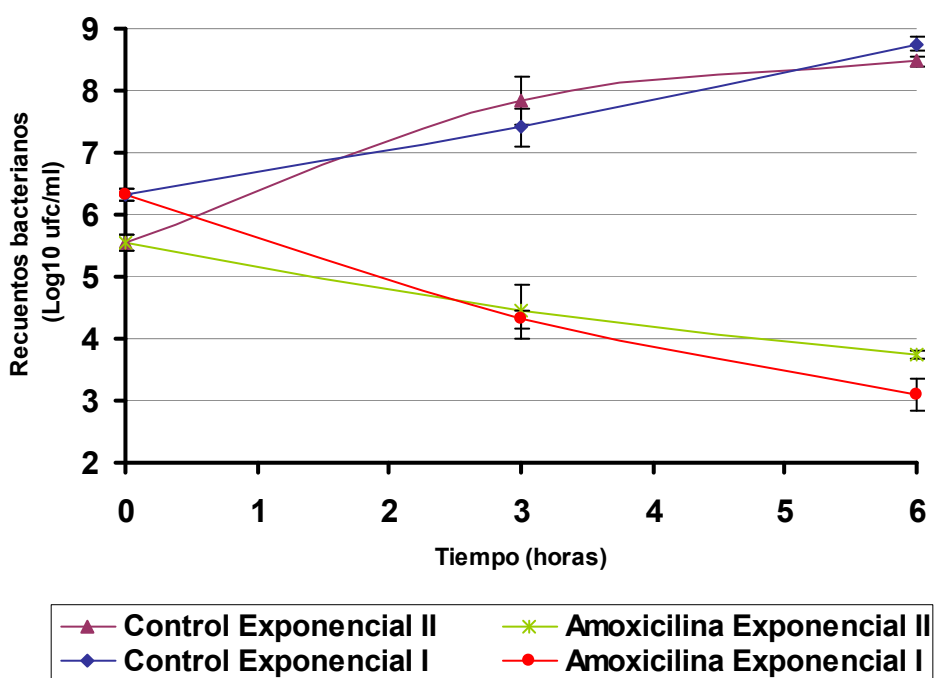


Figura 3. Recuentos bacterianos de un inóculo en fase exponencial I y II de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a $5 \mu\text{g/mL}$ de amoxicilina en THB.

En el ensayo en el que se añadió el antibiótico a un inóculo en fase de crecimiento exponencial (fase exponencial II), se observó una reducción en el número de ufc a las 6 horas de $1,79 \pm 0,10 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ respecto al inóculo inicial. La diferencia con el control a ese tiempo fue de $4,73 \pm 0,35 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

La comparación de los recuentos bacterianos obtenidos a las 3 y 6 horas con dos condiciones experimentales distintas demostró que la reducción en el número de ufc obtenida por amoxicilina fue mayor si el inóculo se añadía a un tubo con antibiótico, en lugar de añadir el antibiótico a un tubo donde la bacteria estuviese creciendo.

En la tabla 3 se muestra el descenso en los recuentos bacterianos en PBS y THB a las 6 horas de incubación de cada tipo de inóculo en presencia de una concentración de 5 µg/mL de amoxicilina.

Tabla 3. Descenso en los recuentos bacterianos de los distintos inóculos a las 6 horas de incubación con 5 µg/mL de amoxicilina (5 veces la CMI).

Tipo de inóculo	Descenso en los recuentos bacterianos (Log ₁₀ ufc/mL, Media ± S.D.)	
	PBS	THB
Suspensión	0,69 ± 0,19	2,53 ± 0,17
Fase exponencial I	0,21 ± 0,15	3,24± 0,12
Fase exponencial II	N.D.	1,79 ± 0,10

En PBS en presencia de amoxicilina, el descenso en los recuentos bacterianos a las 6 horas de incubación fue ligeramente mayor al añadir un inóculo en suspensión en lugar de un inóculo en fase exponencial I, aunque la diferencia en ambos casos fue <1 Log₁₀. Cuando se añadieron tanto el inóculo en suspensión como en fase exponencial I a THB con amoxicilina, se observaron mayores disminuciones en los recuentos bacterianos que en PBS con antibiótico.

En THB con amoxicilina, con el inóculo en fase exponencial I se observó un efecto bactericida de la amoxicilina (reducción ≥ 3 Log₁₀) a las 6 horas de incubación. La adición de 5 µg/mL de amoxicilina a un tubo con un inóculo en crecimiento (fase exponencial II) en THB produjo una menor disminución en los recuentos bacterianos, cuando se comparó con los inóculos en suspensión y fase exponencial I.

1.1.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de eritromicina en distintas condiciones experimentales.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos utilizando un inóculo en suspensión de $6,18 \pm 0,08 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$, ensayado tanto en THB como en PBS, en presencia y ausencia de eritromicina.

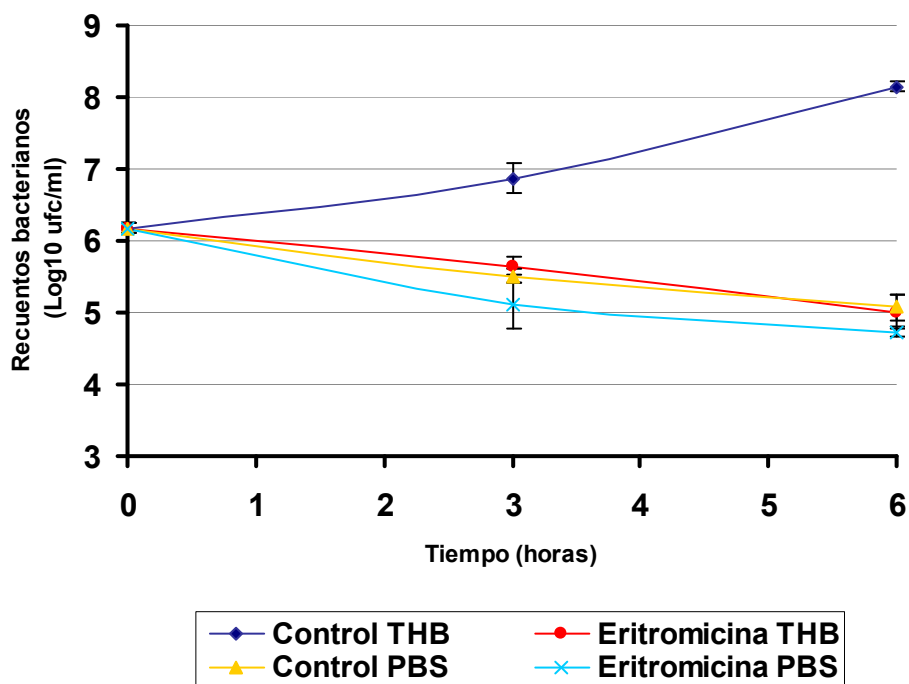


Figura 4. Recuentos bacterianos de un inóculo en suspensión de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a $0,6 \mu\text{g/mL}$ de eritromicina en THB y PBS.

Los recuentos bacterianos experimentaron una reducción espontánea en PBS a las 6 horas, que fue de $1,10 \pm 0,19 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. A ese mismo tiempo, la diferencia en la disminución de los recuentos bacterianos en PBS con eritromicina frente al PBS fue de $0,34 \pm 0,22 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

La reducción bacteriana con eritromicina en THB a las 6 horas fue de $1,17 \pm 0,27 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ frente al inóculo inicial y la diferencia con el control fue de $3,14 \pm 0,05 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos utilizando un inóculo en fase exponencial de $6,13 \pm 0,06 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ que se añadió a un tubo con eritromicina (fase exponencial I) ensayado tanto en THB como en PBS, en presencia y ausencia de eritromicina.

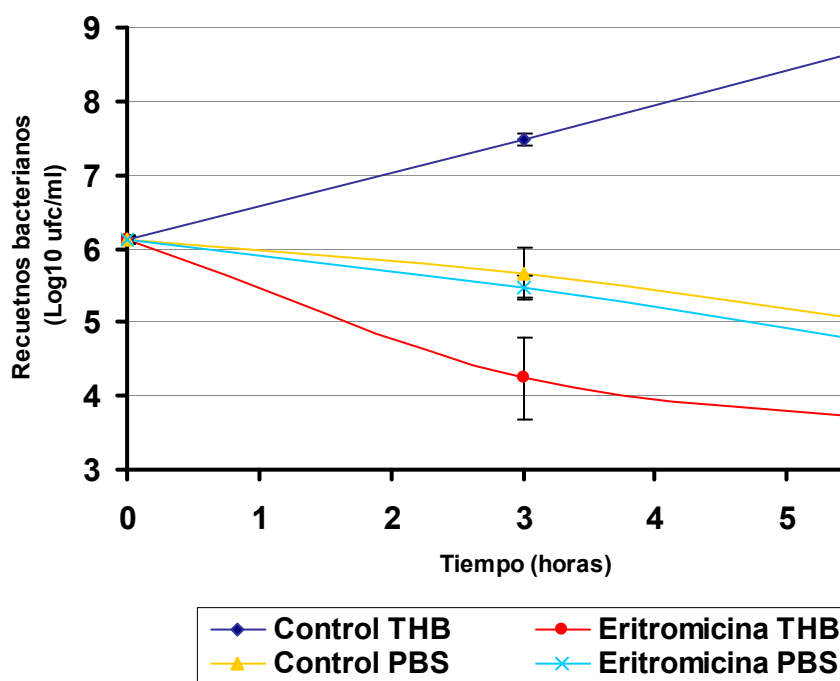


Figura 5. Recuentos bacterianos de un inóculo en fase exponencial I de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a $0,6 \mu\text{g/mL}$ de eritromicina en THB y PBS

A las 6 horas, se observó una reducción espontánea de los recuentos bacterianos en PBS que fue de $1,21 \pm 0,46 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$. La adición de eritromicina a PBS produjo a ese mismo tiempo una reducción bacteriana de $0,29 \pm 0,16 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Eritromicina en THB produjo a las 6 horas una reducción en los recuentos bacterianos de $2,47 \pm 0,59 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ respecto al inóculo inicial. La diferencia con el control fue de $5,22 \pm 0,32 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

Los resultados obtenidos de ambos experimentos (inóculos en suspensión y fase exponencial I) demostraron que:

- 1- La eficacia de eritromicina disminuía en PBS respecto al THB con ambos inóculos.
- 2- La mayor reducción en los recuentos bacterianos se consiguió en THB, tanto si el inóculo se añadió en suspensión como en fase exponencial, aunque esta reducción fue mayor con el inóculo de fase exponencial.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos en THB con un inóculo en fase exponencial de $6,20 \pm 0,60 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ al que se le añadió eritromicina tras 2 horas de crecimiento (fase exponencial II). Los resultados se muestran comparativamente con un inóculo en fase exponencial que se añadió a un tubo con THB y eritromicina (fase exponencial).

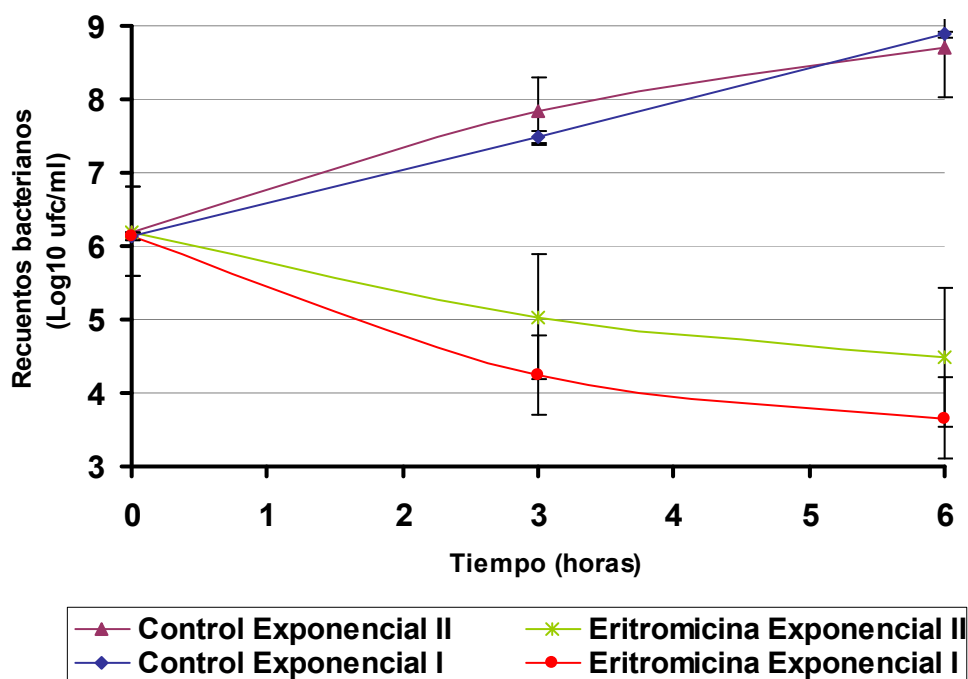


Figura 6. Recuentos bacterianos ($\text{Log}_{10} \text{ ufc/ml}$) de un inóculo en fase exponencial I y II de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a $0,6 \mu\text{g/ml}$ de eritromicina en THB.

En el ensayo en el que se añadió eritromicina a un inóculo en fase de crecimiento exponencial (fase exponencial II), se observó una reducción en el número de ufc a las 6 horas que fue de $1,72 \pm 0,36 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$ respecto al inóculo inicial. La diferencia con el control a ese tiempo fue de $4,24 \pm 0,63 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$.

A las 3 y 6 horas de incubación, la reducción en los recuentos bacterianos por eritromicina fue mayor si el inóculo se añadía a un tubo con antibiótico, en lugar de añadir el antibiótico a un tubo con la bacteria en crecimiento.

En la tabla 4 se muestra la reducción de los recuentos bacterianos en PBS y THB a las 6 horas de incubación de cada tipo de inóculo en presencia de una concentración de 0,6 µg/mL de eritromicina.

Tabla 4. Descenso en los recuentos bacterianos de los distintos inóculos a las 6 horas de incubación con 0,6 µg/mL de eritromicina (5 veces la CMI)..

Tipo de inóculo	Descenso en los recuentos bacterianos (Log ₁₀ ufc/mL, Media ± S.D)	
	PBS	THB
Suspensión	0,34 ± 0,22	1,17 ± 0,27
Fase exponencial I	0,29 ± 0,16	2,47 ± 0,59
Fase exponencial II	N.D.	1,72 ± 0,36

En PBS en presencia de eritromicina, el descenso en los recuentos bacterianos a las 6 horas de incubación fue ligeramente mayor al añadir un inóculo en suspensión en lugar de un inóculo en fase exponencial I, aunque la diferencia en ambos casos fue <0,5 Log₁₀. Cuando se añadieron tanto el inóculo en suspensión como en fase exponencial I a THB con eritromicina, se observaron mayores disminuciones en los recuentos bacterianos que con el PBS en presencia del antibiótico.

En THB con eritromicina, el mayor descenso en los recuentos bacterianos se obtuvo con el inóculo en fase exponencial I, si bien con este antibiótico no se observó efecto bactericida a las 6 horas de incubación. La adición de 0,6 µg/mL de eritromicina a un tubo con un inóculo en crecimiento (fase exponencial II) en THB produjo una menor disminución en los recuentos bacterianos a las 6 horas de incubación cuando se comparó con el inóculo en fase exponencial I, pero que fue ligeramente mayor frente a la obtenida con el inóculo en suspensión (diferencia > 0,5 Log₁₀).

1.1.3.3. Estudio de la asociación de ibuprofeno con antibióticos.

En la figura 7 se compara el efecto de una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina sola o combinada con ibuprofeno a concentraciones de 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$ a lo largo del tiempo sobre un inóculo en fase exponencial I en THB.

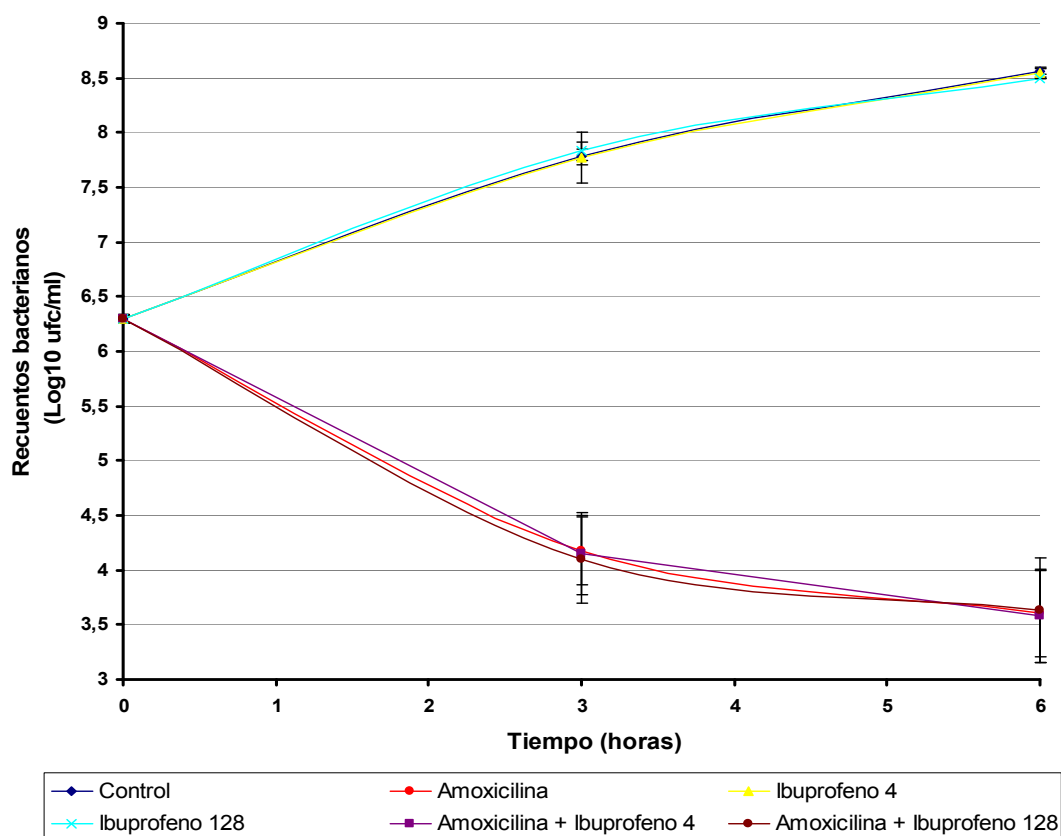


Figura 7. Recuentos bacterianos de un inóculo en fase exponencial I de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a 5 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina sola o combinada con 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno en THB.

Los recuentos bacterianos obtenidos en THB en presencia de ibuprofeno a cualquiera de las concentraciones fueron similares a los obtenidos en el control.

Amoxicilina redujo los recuentos bacterianos respecto al inóculo inicial a las 3 y 6 horas de incubación, tanto en ausencia como en combinación con cualquiera de las concentraciones de ibuprofeno. No se hallaron diferencias entre la reducción bacteriana producida por amoxicilina sola y asociada a ibuprofeno.

En la figura 8 se compara el efecto de la combinación de una concentración de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de eritromicina sola o combinada con ibuprofeno a concentraciones de 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$ a lo largo del tiempo sobre un inóculo en fase exponencial I en THB.

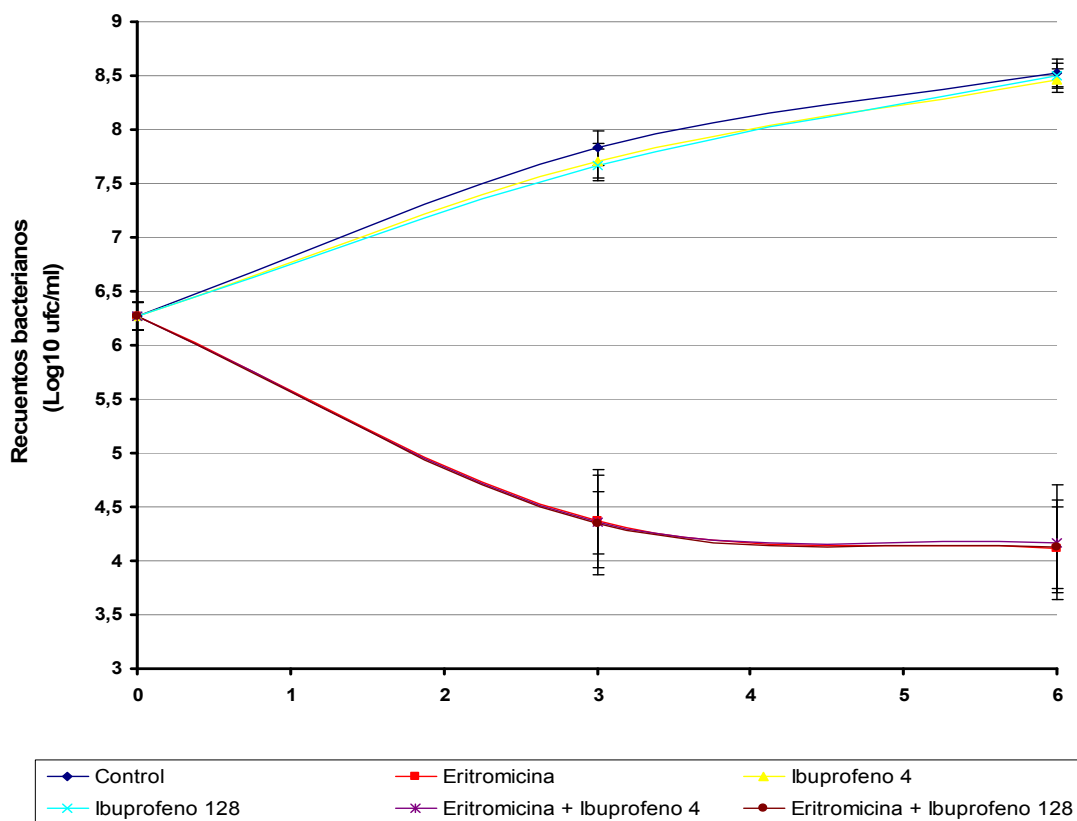


Figura 8. Recuentos bacterianos de un inóculo en fase exponencial I de la cepa *S. pneumoniae* FJD60 tras la exposición a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de eritromicina sola o combinada con 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno en THB.

Nuevamente, los recuentos bacterianos obtenidos en THB en presencia de ibuprofeno a cualquiera de las concentraciones fueron similares a los obtenidos en el control.

Eritromicina redujo los recuentos bacterianos respecto al inóculo inicial a las 3 y 6 horas de incubación, tanto en ausencia como en combinación con cualquiera de las concentraciones de ibuprofeno. Tampoco se hallaron diferencias entre la reducción bacteriana producida por eritromicina sola y asociada a ibuprofeno.

1.2. CAPACIDAD DE ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS SOBRE MATERIAL ABIÓTICO.

1.2.1.Capacidad de adherencia.

1.2.1.1. Comparación de la capacidad de adherencia de las dos cepas.

En la figura 9 se compara la capacidad de adherencia a placas de poliestireno de las cepas *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164 empleando dos técnicas, rascado y sonicación.

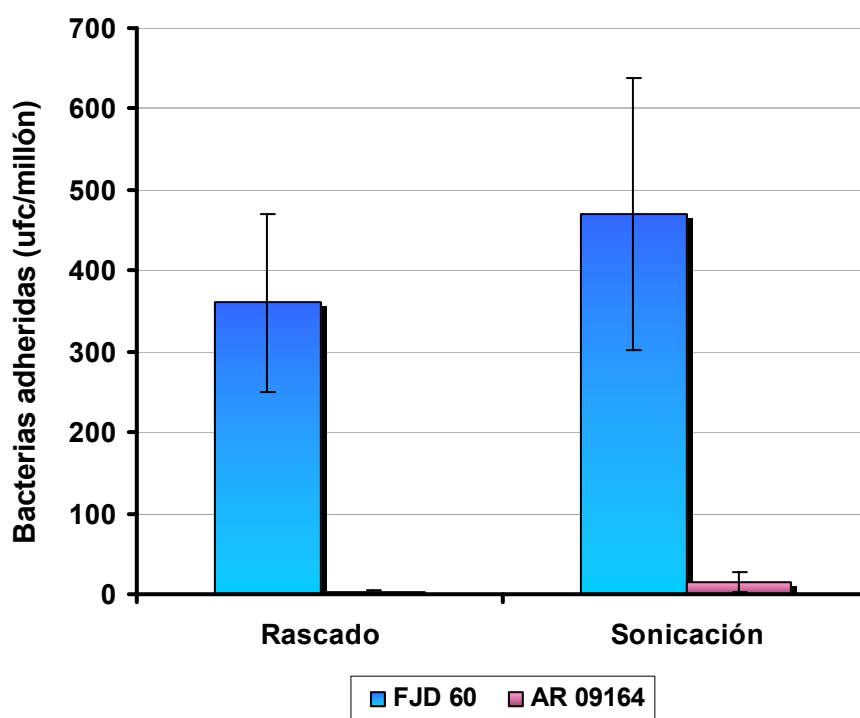


Figura 9. N° de bacterias adheridas (ufc/ millón) de las cepas de *S. pneumoniae* FJD 60 y AR 09164 obtenidas por rascado o sonicación.

El número de bacterias adheridas de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 obtenidas fue de $359,97 \pm 111,02$ ufc/millón con la técnica de rascado y de $470,71 \pm 128,36$ ufc/millón con la técnica de sonicación. Para la cepa *S. pneumoniae* AR 09164 las proporciones obtenidas fueron $2,60 \pm 2,90$ y $13,27 \pm 12,11$ ufc/millón con las técnicas de rascado y sonicación, respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 resulto más adherente sobre placas de poliestireno que la AR 09164 ($p < 0,001$).

1.2.1.2. Impacto del ibuprofeno en la capacidad adherente de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

La figura 10 compara la capacidad de adherencia de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 en ausencia y presencia de ibuprofeno a concentraciones de 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$ con las dos técnicas anteriormente utilizadas.

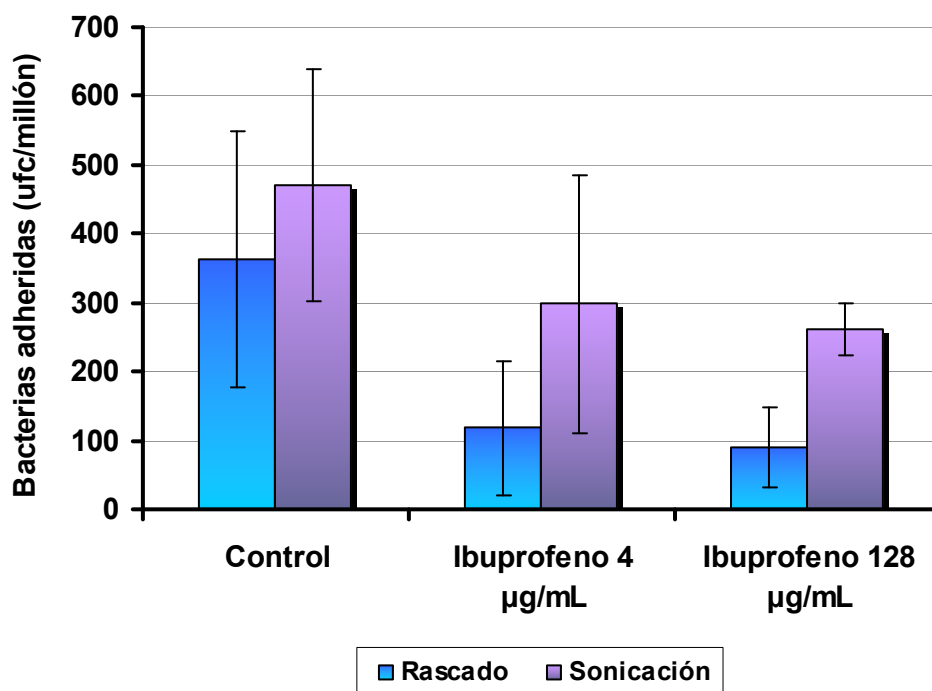


Figura 10. N° de bacterias adheridas (ufc/ millón) obtenidas por rascado o sonicación.

En presencia de ibuprofeno, tanto con la técnica de rascado como con la de sonicación, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en el número de bacterias adheridas frente al control. En ambos casos la mayor diferencia se obtuvo con la concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno ($p < 0,01$) aunque no se apreciaron diferencias significativas entre ambas concentraciones de ibuprofeno.

1.2.1.3. Impacto de la asociación de ibuprofeno y antibióticos sobre la capacidad adherente de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

La figura 11 muestra la adherencia bacteriana en presencia de amoxicilina a dos concentraciones subinhibitorias de 0,25 y 0,12 $\mu\text{g/mL}$, sola o combinada con ibuprofeno a 128 $\mu\text{g/mL}$.

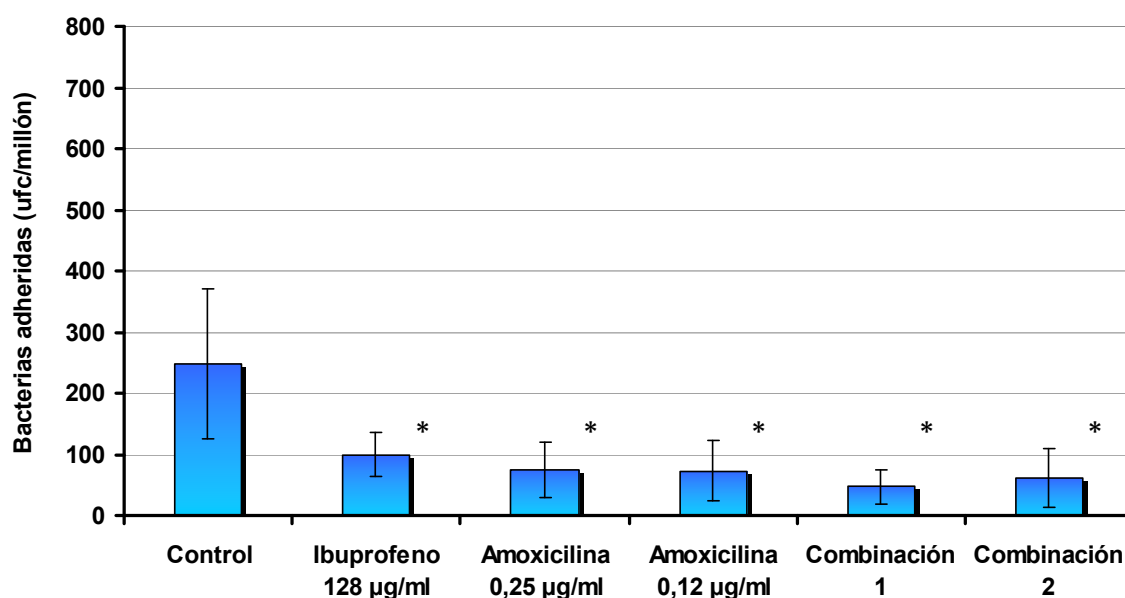


Figura 11. Impacto de la adición de 0,25 y 0,12 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina, sola o asociada a 128 $\mu\text{g/ml}$ de ibuprofeno (Combinación 1 y 2, respectivamente) sobre la adherencia de *S. pneumoniae* FJD 60. * Indica significancia estadística frente al control.

Tanto ibuprofeno como amoxicilina (a cualquiera de las dos concentraciones) disminuyeron significativamente el número de bacterias adheridas ($p < 0,05$). Las combinaciones registraron las mayores reducciones, especialmente la combinación 1 (Ibuprofeno 128 $\mu\text{g/mL}$ y amoxicilina 0,25 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre los productos solos y las combinaciones.

La figura 12 muestra la adherencia bacteriana en presencia de eritromicina a dos concentraciones subinhibitorias de 0,03 y 0,015 $\mu\text{g/mL}$, sola o combinada con ibuprofeno a 128 $\mu\text{g/mL}$.

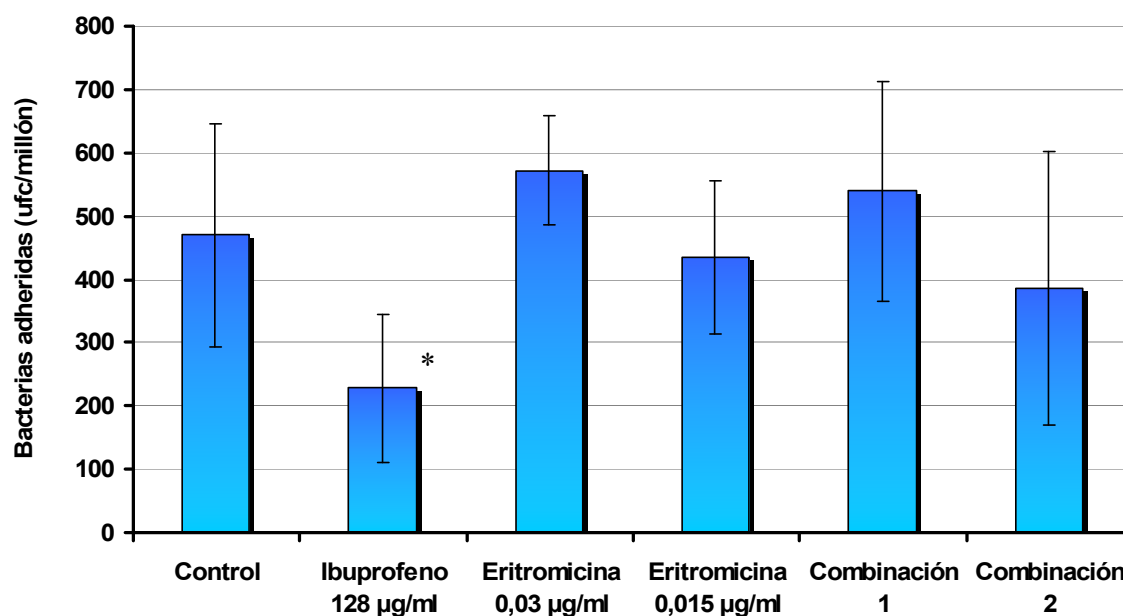


Figura 12. Impacto de la adición de 0,03 y 0,015 $\mu\text{g/mL}$ de eritromicina, sola o asociada a 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno (Combinación 1 y 2, respectivamente) sobre la adherencia de *S. pneumoniae* FJD 60. * Indica significancia estadística frente al control.

Ibuprofeno solo a concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó significativamente el número de bacterias adheridas frente al control ($p < 0,05$). Eritromicina no disminuyó la adherencia bacteriana. Cuando se combinó este antibiótico a dosis de 0,015 $\mu\text{g/mL}$ con ibuprofeno disminuyó la adherencia respecto a eritromicina sola, aunque esta disminución no fue significativa.

1.2.2. Formación de biopelículas.

1.2.2.1. Características de la biopelícula.

En la figura 13 se muestran, comparativamente, las D.O.₅₇₀ obtenidas por el control sin bacteria (Cw), *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164 a las 16 y 24 horas de incubación sobre placas de poliestireno con fondo plano.

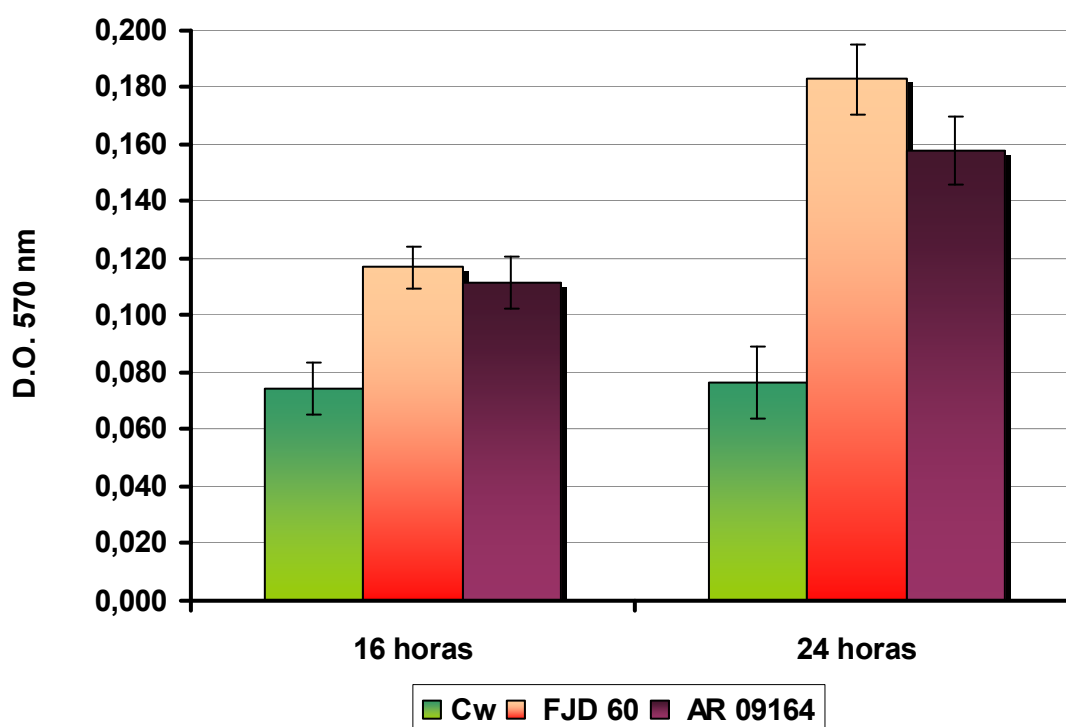


Figura 13. D.O._{570 nm} (Media ± D.E.) obtenidas por el control sin bacteria (Cw) y dos cepas de *S. pneumoniae*, FJD 60 y AR 09164, después de 16 y 24 horas de incubación.

A las 16 horas de incubación la lectura de la D.O._{570 nm} en el control sin bacteria (Cw) fue $0,074 \pm 0,009$ y en las cepas de *S. pneumoniae* FJD 60 y AR 09164, fueron de $0,117 \pm 0,007$ y $0,111 \pm 0,009$, respectivamente. Aunque los valores de D.O._{570 nm} de ambas cepas fueron superiores al obtenido por Cw, ninguno de ellos lo duplicó.

A las 24 horas de incubación la lectura de la D.O._{570 nm} en Cw fue $0,079 \pm 0,013$ y en las cepas de *S. pneumoniae* FJD 60 y AR 09164, fueron de $0,183 \pm 0,012$ y $0,158 \pm 0,012$, respectivamente. Los valores de D.O._{570 nm} de ambas cepas duplicaron el valor de D.O._{570 nm} obtenido por Cw.

1.2.2.2. Comparación de la biopelícula formada por las dos cepas.

En la figura 14 se compara la biopelícula (D.O.₅₇₀ - Cw₅₇₀) obtenida por cada cepa bacteriana a las 16 y 24 horas de incubación sobre placas de poliestireno con fondo plano.

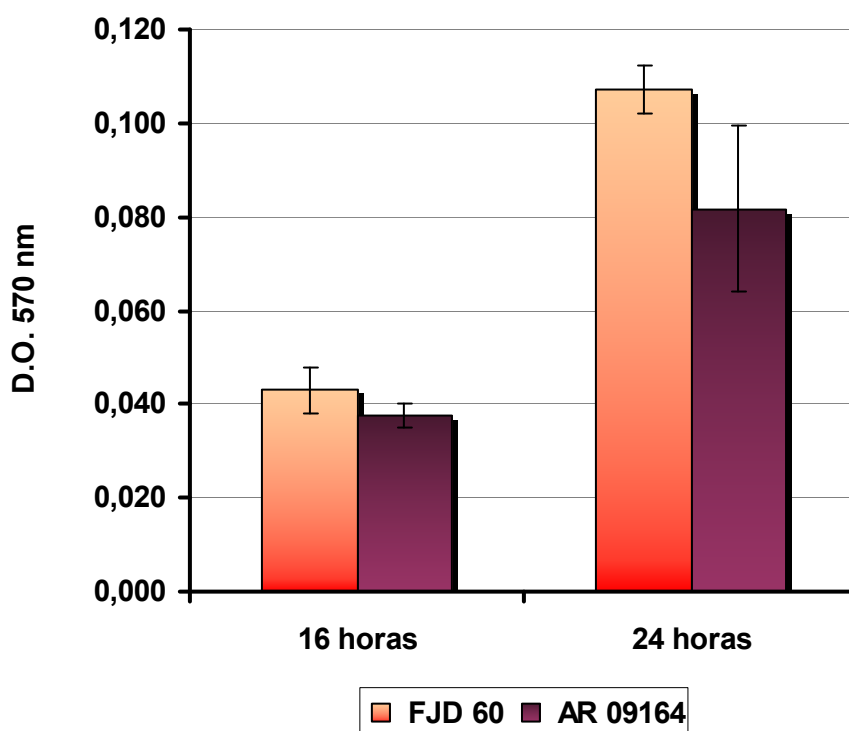


Figura 14. Comparación de la biopelícula (D.O.₅₇₀ - Cw₅₇₀) obtenida por dos cepas de *S. pneumoniae*, FJD 60 y AR 09164 a las 16 y 24 horas de incubación. Influencia del tiempo de incubación en la formación de biopelícula.

A las 16 horas de incubación, las biopelículas formadas por ambas cepas fueron similares, con una D.O._{570 nm} de $0,043 \pm 0,005$ para *S. pneumoniae* FJD 60 y una D.O._{570 nm} de $0,038 \pm 0,00$ para *S. pneumoniae* AR 09164.

A las 24 horas de incubación, las D.O._{570 nm} obtenidas con *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164 fueron de $0,107 \pm 0,005$ y $0,082 \pm 0,02$, respectivamente. Se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) en la biopelícula formada por cada cepa bacteriana respecto a las 16 horas de incubación. Al comparar la biopelícula obtenida por cada cepa a las 24 horas, se observó que *S. pneumoniae* FJD 60 presentaba una mayor capacidad para establecer biopelícula ($p < 0,001$).

La turbidez (expresada como D.O._{630 nm}) alcanzada por la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 a las 16 y 24 horas de incubación fue de $0,132 \pm 0,02$ y $0,132 \pm 0,01$, respectivamente. Así mismo, la D.O._{630 nm} alcanzada por la cepa de *S. pneumoniae* AR 09164 a las 16 y 24 horas de incubación fue de $0,123 \pm 0,02$ y $0,144 \pm 0,01$, respectivamente.

En la tabla 5 se muestran los recuentos de las bacterias planctónicas y adheridas en biopelícula a las 16 y 24 horas de incubación sobre placas de poliestireno con fondo plano, de cada una de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas, FJD 60 y AR 09164.

Tabla 5. Recuentos de bacterias planctónicas y adheridas en biopelícula a las 16 y 24 horas de incubación.

Cepa de <i>S.pneumoniae</i>	Tiempo de incubación (horas)	Inóculo inicial ¹	Bacterias planctónicas ¹	Bacterias en biopelícula ¹
FJD 60	16	$6,80 \pm 0,35$	$6,80 \pm 0,43$	$5,45 \pm 0,34$
	24	$6,79 \pm 0,16$	$4,50 \pm 0,68$	$3,82 \pm 0,41$
AR 09164	16	$6,94 \pm 0,05$	$6,23 \pm 0,13$	$4,15 \pm 0,51$
	24	$6,97 \pm 0,10$	$4,74 \pm 0,12$	$3,14 \pm 0,37$

1. Expresadas en Log₁₀ ufc/mL (Media \pm D.E.)

A las 16 horas, el número de bacterias planctónicas fue semejante al inóculo inicial en los ensayos con ambas cepas. A ese mismo tiempo, la proporción del nº de bacterias presentes en biopelícula frente a las planctónicas fue del 80,15 % en el caso de *S. pneumoniae* FJD 60 y del 66% para *S. pneumoniae* AR 09164.

Aunque la turbidez fue prácticamente la misma a las 16 y las 24 horas de incubación con *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164, la viabilidad tanto de las bacterias planctónicas como adheridas en biopelícula de ambas cepas disminuyó a las 24 horas respecto a las 16 horas (diferencias de 2,30 y 1,63 Log₁₀ para *S. pneumoniae* FJD 60 y 1,49 y 1,01 Log₁₀ para *S. pneumoniae* AR 09164, respectivamente). A ese tiempo, la proporción del número de bacterias presentes en biopelícula frente a las bacterias planctónicas fue del 85 % en el caso de *S. pneumoniae* FJD 60 y del 66% para *S. pneumoniae* AR 09164.

Las proporciones de bacterias adheridas en biopelícula / bacterias planctónicas fueron prácticamente las mismas para cada cepa a las 16 y 24 horas de incubación. La mayor proporción la obtuvo la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60.

1.2.2.3. Impacto del ibuprofeno sobre la formación de biopelícula de la cepa *S.pneumoniae* FJD 60.

En la figura 15 se muestra la formación de biopelícula de la cepa en presencia de distintas concentraciones de ibuprofeno (0,25 – 128 µg/mL) a las 24 horas de incubación.

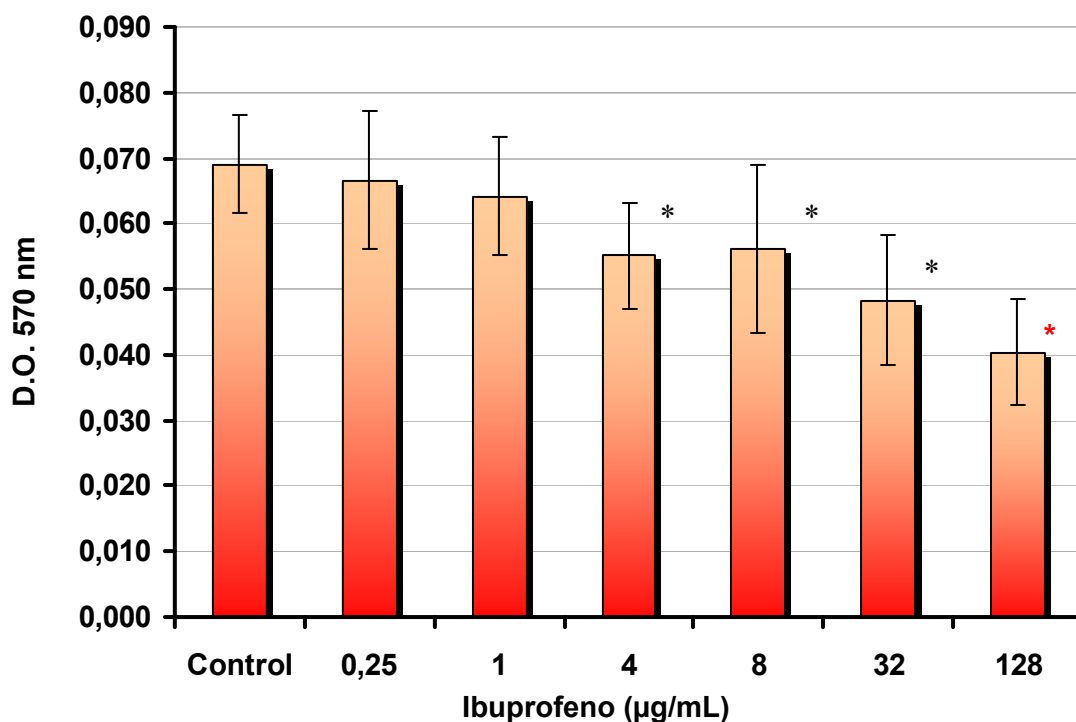


Figura 14. Impacto de concentraciones subinhibitorias de ibuprofeno sobre la capacidad de la cepa de *S.pneumoniae* FJD 60 para formar biopelícula. * Indica significancia estadística frente al control y * significancia estadística frente al resto de las concentraciones.

Ibuprofeno no modificó ni el crecimiento de la cepa en el rango de concentraciones estudiado. Sí disminuyó su capacidad para formar biopelícula respecto al control aunque solo a partir de una concentración de 4 µg/mL del fármaco se produjo una reducción significativa de la biopelícula. La mayor inhibición de biopelícula respecto al control se observó con la concentración de 128 µg/mL ($p < 0,0001$) que también resultó significativa frente al resto de las concentraciones estudiadas ($p < 0,05$ para 32 µg/mL y $p < 0,001$ para el resto).

1.2.2.4. Visualización de la biopelícula formada por la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 mediante microscopía confocal sin y con 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno.

En la figura 16 se muestran, mediante microscopía confocal, dos biopelículas formadas por la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 tras 24 horas de incubación, en ausencia y en presencia de 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno, respectivamente.

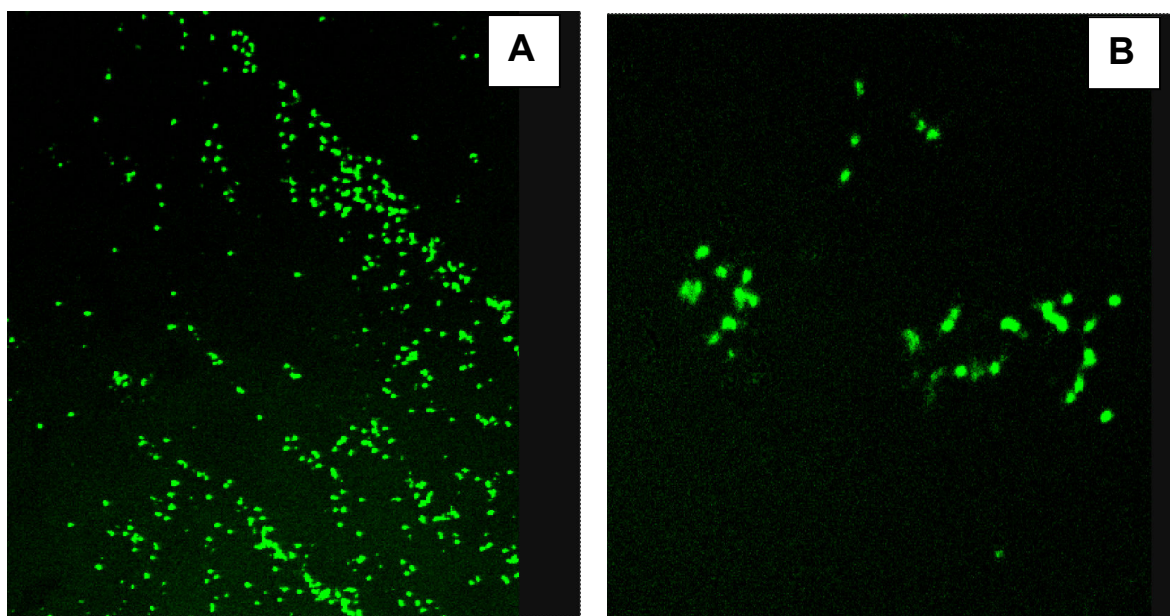


Figura 16. Las imágenes de microscopía confocal A y B, muestran la biopelícula formada a las 24 horas por la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 en MHB II solo (A) o con 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno (B).

La presencia de una concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno en el medio produjo cambios morfológicos en la formación de biopelícula observables mediante microscopía confocal (menor número de agregados bacterianos en general, aunque con mayor tamaño frente al control). Las variaciones observadas indicarían una reducción importante en la capacidad de formación de biopelícula para esta cepa cuando la incubación se realizaba en presencia de esta concentración de ibuprofeno.

2. ESTUDIOS IN VIVO.

2.1. MODELO EXPERIMENTAL DE OMA.

2.1.1. Modelo experimental de OMA con las dos cepas de *S. pneumoniae*.

En la tabla 5 se comparan los resultados obtenidos en los diferentes parámetros en una OMA experimental inducida por *S. pneumoniae* FJD 60 y por *S. pneumoniae* AR 09164. Se inocularon $5,42 \pm 0,17 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído}$ de la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 y $5,38 \pm 0,10 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído}$ de la cepa de *S. pneumoniae* AR 09164.

Tabla 5. Comparación de los de los parámetros estudiados en un modelo experimental de OMA inducido por dos cepas de *S. pneumoniae*.

Parámetro evaluado	<i>S.pneumoniae</i> FJD 60	<i>S.pneumoniae</i> AR 09164	Significado estadístico (valor de p)
OMA observada (%)	90,6	28,1	< 0,001
Pérdida de peso (%)	$9,18 \pm 3,51$	$4,07 \pm 4,27$	0,001
Presencia de otorrea (%)	96,9	62,5	< 0,001
Nº de oídos con cultivo positivo (%)	81,2	53,1	0,017
Recuentos bacterianos ($\text{Log}_{10} \text{ ufc}/20 \mu\text{L}$)	$2,20 \pm 1,02$	$1,56 \pm 1,06$	0,018
Recuentos de PMN	$3,27 \pm 1,68$	$2,07 \pm 1,16$	0,044

La cepa *S. pneumoniae* FJD 60 registró los mayores porcentajes de OMA, pérdida de peso, presencia de otorrea y número de oídos con cultivo positivo, así como los mayores recuentos bacterianos y de PMN. Las diferencias entre ambas cepas fueron significativas para todos los parámetros evaluados siendo la $p < 0,001$ para los porcentajes de OMA y el de otorrea y $p < 0,05$ para el resto de los parámetros, por lo que la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 se consideró más virulenta que la cepa AR 09164, y se seleccionó para estudios posteriores

2.1.2. Evolución de una OMA experimental inducida por la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

En la tabla 6 se recogen los resultados correspondientes a los diferentes parámetros evaluados a distintos tiempos p.i. tras la inoculación bilateral en el oído medio de 35 animales con $6,37 \pm 0,37 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído}$ de la cepa *S. pneumoniae* FJD 60

Tabla 6. Evaluación de una OMA inducida por *S. pneumoniae* FJD 60 a las 5, 18, 21, 48 y 67 horas y 7 y 15 días p.i.

TIEMPO DESDE LA INOCULACIÓN BACTERIANA	ASPECTO OTOSCÓPICO	% OÍDOS CON CULTIVO POSITIVO	RECuentos BACTERIANOS $\text{Log}_{10} \text{ ufc}/20 \mu\text{l}$
5 horas	OMA con oído seco	100	$6,90 \pm 1,59$
18 horas	OMA con otorrea	100	$6,55 \pm 0,50$
21 horas	OMA con otorrea	100	$5,39 \pm 1,16$
48 horas	OMA con otorrea	100	$3,18 \pm 0,57$
67 horas	OMA, OMD y OMI	70	$2,22 \pm 1,02$
7 días	OMI y OMD	30	$1,80 \pm 0,80$
15 días	OMD y curación	10	0,6

Se observó presencia de OMA a las 5 horas p.i., aunque no se detectó presencia de otorrea. La OMA con otorrea se observó a las 18 horas p.i. en la mayoría de los oídos y se mantuvo a las 21 y 48 horas p.i. A las 67 horas p.i. se observaron los tres tipos de otitis, lo que indicaba que la enfermedad había comenzado a resolverse de forma espontánea. A los 7 días p.i. ya no se observó presencia de OMA, los oídos mostraban OMI y OMD y a los 15 días p.i., solo se observaron oídos con OMD y en fase de curación.

Todas las muestras extraídas del oído medio tomadas entre las 5 y las 48 horas tuvieron cultivos positivos, mientras que a las 67 horas p.i. empezaron a observarse oídos con cultivo negativo. A los 7 y 15 días p.i. los oídos con cultivo positivo se redujeron a un 30 y un 10 %, respectivamente.

Los recuentos bacterianos de exudado del oído medio fueron mayores a las 5 horas p.i., ligeramente más altos que el inicial. Se observó una disminución en el número de recuentos bacterianos a medida que aumentaba el tiempo p.i. y que a las 48 horas fue de $3,18 \pm 0,57$. A los 15 días solo hubo un oído con cultivo positivo que se situó en el límite de detección (0,6).

Por lo que respecta a otros datos se observó que a las 24 horas p.i., los animales presentaban el pelaje apelmazado y letargo. El descenso en la media ponderal a las 48 horas fue de $13,98 \pm 3,07$ (%). A los 7 días, disminuyó el porcentaje de pérdida de peso y a los 15 días la mayoría de los animales había recuperado totalmente su peso inicial.

Los PMN ya estaban presentes a las 5 horas p.i. y su número se mantuvo próximo a los recuentos obtenidos a las 5 horas hasta las 48 horas p.i., aunque luego disminuyó paulatinamente

2.2. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS.

2.2.1.- Estudios con amoxicilina.

2.2.1.1. *Parámetros farmacocinéticos del antibiótico en suero.*

Los datos obtenidos de los bioensayos permitieron demostrar que la concentración de amoxicilina en suero, a los 15 minutos de ser administrada una dosis de 5 mg/kg de dicho antibiótico, fue de $12,2 \pm 2,80$ $\mu\text{g/mL}$. La vida media de amoxicilina y el ABC se estimaron en 18 min y $10,5 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ respectivamente.

2.2.1.2. *Parámetros farmacocinéticos e índices farmacodinámicos del antibiótico en las muestras de exudado del oído medio en animales inoculados con la cepa S. pneumoniae FJD 60.*

La tabla 7 muestra los parámetros farmacocinéticos de amoxicilina en el oído medio de gerbos con OMA tras administración de una dosis de 5 mg/kg de dicho antibiótico conforme a dos pautas de tratamiento: 5 horas p.i. y 21 horas p.i.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos en el exudado del oído medio de animales inoculados con la cepa S. pneumoniae FJD 60 obtenidos con una dosis de 5 mg/kg de amoxicilina administrada a las 5 y 21 horas p.i.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de administración post-inoculación (horas)	Concentración a los 90 minutos ($\mu\text{g/mL}$)	Vida media (min)	ABC ($\mu\text{g} \times \text{h/mL}$)
5	5	5,55	77	16,4
5	21	2,33	30	3,9

Tanto la concentración de amoxicilina en el oído medio a los 90 minutos, como la vida media y el ABC, disminuían cuando este antibiótico se administraba a las 21 horas p.i.

La tabla 8 muestra los índices farmacodinámicos de amoxicilina en el oído medio del gerbo tras administración de una dosis de 5 mg/kg de dicho antibiótico conforme a dos pautas de tratamiento: 5 horas p.i. y 21 horas p.i.

Tabla 8. Índices farmacodinámicos en el exudado del oído medio obtenidos por una dosis de 5 mg/kg de amoxicilina administrada a las 5 y 21 horas p.i. frente a la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de administración post-inoculación (horas)	$C_{90 \text{ min}}$ / CMI ($\mu\text{g/mL}$)	ABC / CMI	$t > \text{CMI}$ en min
5	5	5,55	16,4	270
5	21	2,33	3,9	55

El índice ABC/CMI, disminuyó cuando amoxicilina se administraba a las 21 h p.i. El tiempo por encima de la CMI ($t > \text{CMI}$) también disminuyó ya que fue de 270 min cuando el antibiótico se administraba a las 5 h p.i. y de 55 min cuando la administración se realizaba a las 21 h p.i.

2.2.2. Estudios con eritromicina.

2.2.2.1. *Parámetros farmacocinéticos del antibiótico en suero.*

La concentración de eritromicina en suero, a los 15 minutos de ser administrada una dosis de 5 mg / kg del antibiótico, fue de $1,64 \pm 0,21$ µg/mL. Se estimó la vida media del antibiótico en 31 minutos. Se obtuvo un ABC de 1,64 µg x horas / mL.

2.2.2.2. *Parámetros farmacocinéticos e índices farmacodinámicos del antibiótico en las muestras de exudado del oído medio en animales inoculados con la cepa S. pneumoniae FJD 60.*

En la tabla 9 se muestran los parámetros farmacocinéticos de eritromicina obtenidos en gerbos con OMA tras la administración de una dosis de 5 mg/kg de dicho antibiótico a las 5 y 21 horas p.i., respectivamente.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos en el exudado del oído medio de animales inoculados con la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 obtenidos con una dosis de 5 mg/kg de eritromicina administrada a las 5 y 21 horas p.i.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de administración post-inoculación (horas)	Concentración a los 90 minutos (µg/mL)	Vida media (min)	ABC (µg x h/mL)
5	5	0,74	98,2	2,47
5	21	0,79	47,5	1,46

Aunque la administración a las 21 horas p.i. de eritromicina no influía en la concentración alcanzada a los 90 minutos por este antibiótico en el oído medio del modelo experimental, se observó una disminución en el resto de los parámetros considerados. La vida media y el ABC se redujeron aproximadamente a la mitad.

La tabla 10 muestra los índices farmacodinámicos de eritromicina obtenidos en el oído medio tras la administración de una dosis de 5 mg/kg de dicho antibiótico a las 5 y 21 horas p.i., respectivamente.

Tabla 10. Índices farmacodinámicos en el exudado del oído medio por una dosis de 5 mg/kg de eritromicina administrada a las 5 y 21 horas p.i. frente a la cepa *S. pneumoniae* FJD 60.

Dosis (mg/kg)	Tiempo de administración post-inoculación (horas)	$C_{90 \text{ min}}$ / CMI ($\mu\text{g/mL}$)	ABC / CMI	$t > \text{CMI}$ en min
5	5	6,16	20,6	219,1
5	21	6,58	12,2	110,83

Nuevamente, el índice ABC/CMI disminuía cuando el antibiótico se administraba a las 21 h p.i.

2.3. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS E IBUPROFENO Y ESTUDIOS DE EFICACIA EN OMA PARA LA CEPA *S. pneumoniae* FJD 60.

2.3.1. Valoración de la eficacia de amoxicilina sola o asociada a ibuprofeno.

2.3.1.1. Eficacia de un tratamiento precoz con una dosis única.

En la figura 17 se muestran los resultados otoscópicos obtenidos en cada grupo para el régimen de una dosis de amoxicilina y/o ibuprofeno administrados a las 5 h p.i. tras la inoculación de $6,26 \pm 0,39 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído}$ de *S. pneumoniae* FJD 60.

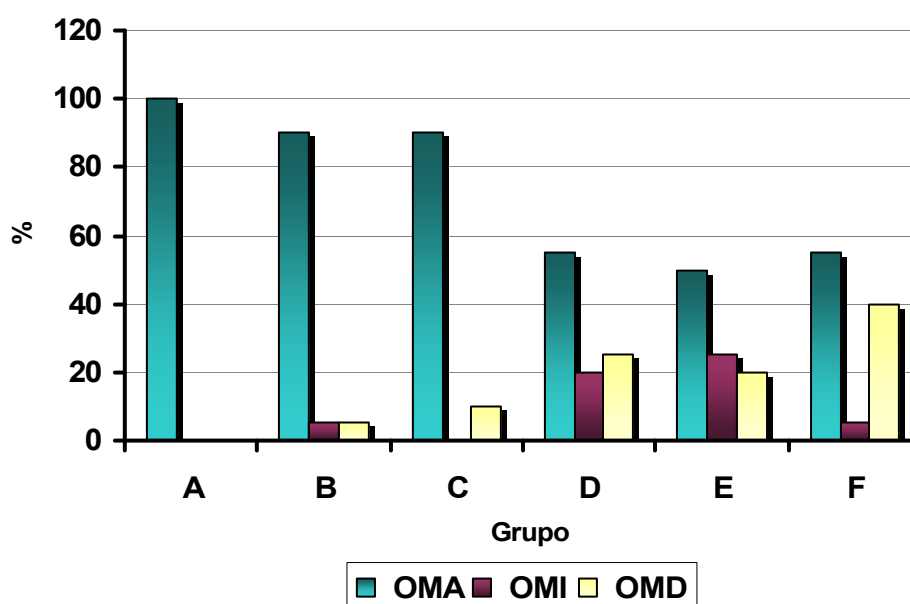


Figura 17. Resultados otoscópicos (%) obtenidos a las 48 h p.i. Las letras designan el grupo de estudio y la posología de los fármacos se indica por dosis : A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno , y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

Todos los animales del grupo A (control) desarrollaron OMA en ambos oídos. En los grupos B y C (tratados con 2,5 y 7,5 mg/kg de ibuprofeno, respectivamente) esto ocurrió en el 90% de los oídos estudiados. En el grupo B, se registró un caso de OMI y otro de OMD. En el grupo C, dos de los animales desarrollaron OMD en un oído.

En los grupos D, E y F, que fueron tratados con amoxicilina, se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en los casos de OMA frente a los grupos que no recibieron el antibiótico (A, B y C). Los animales del grupo D (amoxicilina sola) registraron prácticamente el mismo número de casos de OMA que los de los grupos E y F (amoxicilina con 2,5 mg/kg y 7,5 mg/kg de ibuprofeno, respectivamente). El mayor n° de casos de OMD se observó en el grupo F, que se había tratado con la dosis más alta de ibuprofeno. No hubo diferencias entre los tres grupos que recibieron amoxicilina.

En la tabla 11 se muestran los datos obtenidos en cada grupo para el resto de los parámetros estudiados.

Tabla 11. Eficacia de 5 mg/kg de amoxicilina administrada sola o combinada con 2,5 o 7,5 mg/kg de ibuprofeno a las 5 h p.i.

GRUPO	PORCENTAJE		RECIENTOS BACTERIANOS	RECIENTOS DE PMN
	PÉRDIDA DE PESO (Media ± D.E.)	OÍDOS CON OTORREA	OÍDOS CON CULTIVO POSITIVO	Log ₁₀ ufc/20 µl (Media ± D.E)
A	12,94 ± 3,16	100	100	2,66 ± 0,65
B	10,76 ± 5,38	100	95	2,69 ± 0,72
C	12,35 ± 3,19	85	95	2,90 ± 0,86
D	3,41 ± 3,47 ¹	65 ²	40 ¹	1,21 ± 0,84 ¹
E	1,69 ± 2,67 ¹	50 ¹	35 ¹	1,11 ± 1,00 ¹
F	0,92 ± 3,35 ¹	35 ¹	20 ¹	0,85 ± 0,61 ¹

¹. Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a los animales no tratados con el antibiótico (A, B y C).

². Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente al grupo A (control) y el B (2,5 mg/kg de ibuprofeno).

Las letras designan el grupo de estudio: A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno, y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

El examen de la media ponderal mostró que los animales de los grupos A, B y C, que no recibieron amoxicilina, experimentaron la mayor pérdida de peso y no se observaron diferencias significativas entre ellos. El tratamiento con una dosis de 5 mg/kg de amoxicilina administrada sola y con ibuprofeno disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) la pérdida de peso cuando se compararon los grupos D, E y F, que recibían el antibiótico, frente a los que no lo recibieron. Los grupos E y F, que recibieron ibuprofeno asociado a amoxicilina registraron una menor pérdida de peso frente al grupo D (tratado con amoxicilina sola), aunque las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas.

La otorrea estuvo presente en todos los oídos de los grupos A (control) y B (ibuprofeno 2,5 mg/kg), pero en el grupo C (ibuprofeno 7,5 mg/kg) hubo tres oídos donde no se observó. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos que no recibieron antibiótico. En los grupos D, E y F, que recibieron amoxicilina, el porcentaje de oídos con otorrea fue menor. En el grupo D se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a los animales no tratados con antibiótico de los grupos A y B. En los grupos E y F, las diferencias fueron significativas respecto a todos los grupos que no recibieron antibiótico. Por otro lado, Los grupos E y F, que recibieron ibuprofeno asociado a amoxicilina, registraron un menor porcentaje de otorrea frente al grupo D, tratado con amoxicilina sola, aunque no se hallaron diferencias significativas cuando se compararon los tres grupos entre sí.

Todos los cultivos de las muestras de exudado del oído medio en los animales del grupo A fueron positivos, mientras que en los grupos B y C hubo un animal en el que el cultivo de las muestras extraídas de uno de sus oídos fue negativo. En todos los grupos tratados con amoxicilina, se observó una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en el número de muestras con cultivo positivo frente a los grupos que no recibieron el antibiótico. El número de oídos con cultivo positivo fue menor en los grupos E y F, tratados con amoxicilina e ibuprofeno, que en el grupo D, que recibió el antibióticos solo, aunque no se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos.

Los recuentos bacterianos en los grupos A, B y C, que no recibieron tratamiento antimicrobiano fueron similares. Se observó en los grupos D, E y F, que recibían amoxicilina, una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en los recuentos bacterianos frente a los grupos que no se trataron con el antibiótico, pero no hubo diferencias entre los tres grupos cuando se compararon entre sí.

Respecto a los recuentos de PMN, los grupos que recibieron amoxicilina registraron una reducción significativa de los recuentos de PMN frente a los grupos que no la recibieron aunque no hubo diferencias entre ellos.

De los 6 parámetros estudiados, los mejores resultados se obtuvieron en los grupos que recibieron ibuprofeno asociado a antibiótico, sobre todo en el grupo F, que recibió la dosis de ibuprofeno más alta.

2.3.1.2. Eficacia de un tratamiento tardío con dosis múltiples.

En la figura 18 se muestran los resultados otoscópicos obtenidos en cada grupo para el régimen de 5 dosis de amoxicilina y/o ibuprofeno a las 18, 21, 24, 27 y 30 h p.i. tras la inoculación de $6,14 \pm 0,07 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído}$ de *S. pneumoniae* FJD 60.

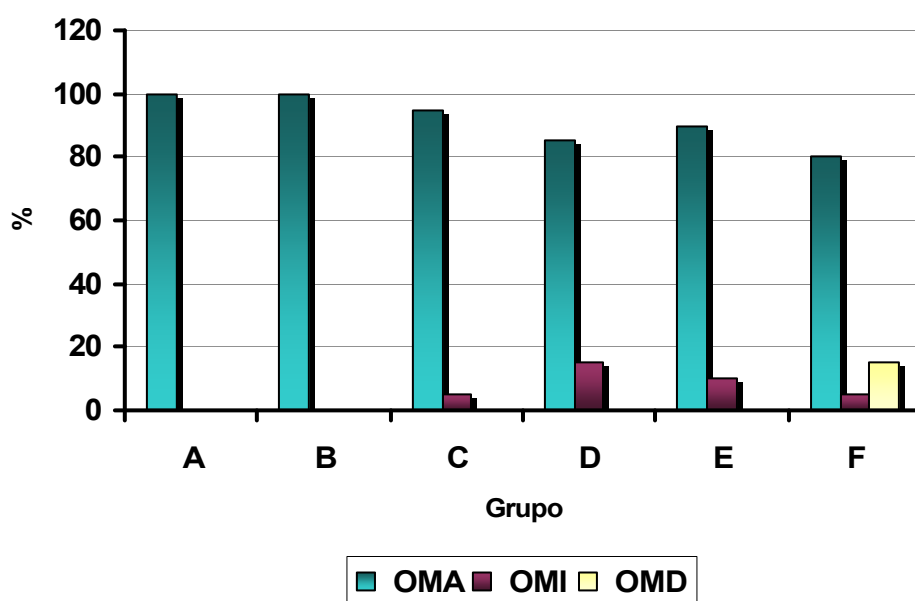


Figura 18. Resultados otoscópicos (%) obtenidos a las 48 h p.i. Las letras designan el grupo de estudio y la posología de los fármacos se indica por dosis : A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno , y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

En los grupos que no se trataron con amoxicilina, todos los animales de los grupos A (control) y B (ibuprofeno 2,5 mg/kg) que desarrollaron OMA. En el grupo C, que recibió 7,5 mg/kg de ibuprofeno, hubo un animal que presentó OMI en un oído.

En los grupos D, E y F, tratados con amoxicilina, se observaron menos casos de OMA frente a los grupos que no recibieron el antibiótico. En los grupos D (amoxicilina sola) y E (amoxicilina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno).se registraron, tres y dos casos de OMI, respectivamente. Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo F (amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno) que presentó el menor número de casos de OMA y el mayor número de casos de OMD. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los 3 grupos con tratamiento antimicrobiano entre sí.

En la tabla 12 se muestran los datos obtenidos en cada grupo para el resto de los parámetros estudiados.

Tabla 12. Eficacia de 5 mg/kg de amoxicilina administrada sola o combinada con 2,5 o 7,5 mg/kg de ibuprofeno en 5 dosis las 18, 21, 24, 27 y 30 h p.i.

GRUPO	PORCENTAJE			RECuentos BACTERIANOS	RECuentos DE
	PÉRDIDA DE PESO (Media \pm D.E.)	OÍDOS CON OTORREA	OÍDOS CON CULTIVO POSITIVO	Log ₁₀ ufc/20 μ l (Media \pm D.E.)	PMN (Media \pm D.E.)
A	11,40 \pm 2,02	100	100	3,19 \pm 0,73	3,63 \pm 2,16
B	9,35 \pm 3,79	90	85	2,62 \pm 1,11	2,67 \pm 2,55
C	13,18 \pm 2,50	95	95	2,59 \pm 0,97	4,22 \pm 3,30
D	8,68 \pm 2,04 ²	100	95	2,25 \pm 0,78 ³	2,74 \pm 1,30
E	9,57 \pm 3,76	95	85	1,82 \pm 0,92 ¹	1,92 \pm 1,48
F	6,79 \pm 2,46 ²	70	80	1,79 \pm 0,93 ¹	2,15 \pm 1,45

¹. Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a los animales no tratados con el antibiótico (A, B y C).

². Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente al grupo A (control) y el C (7,5 mg/kg de ibuprofeno).

³. Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente al grupo A (control).

Las letras designan el grupo de estudio: A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de amoxicilina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno, y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

Tras el examen de la media ponderal, se observó que, de los grupos que no recibieron amoxicilina, fueron los animales de los grupos A (control), y C (ibuprofeno 7,5 mg/kg) los que experimentaron la mayor pérdida de peso. Los animales en el grupo B, que recibieron 2,5 mg/kg de ibuprofeno, mostraron una menor reducción de peso, pero no hubo diferencias significativas entre los tres grupos que no recibieron tratamiento antimicrobiano. En los grupos tratados con amoxicilina D y F se registró una reducción significativa ($p \leq 0,05$) de la pérdida de peso frente a los grupos A y C. El grupo F, que recibió amoxicilina e ibuprofeno a dosis más alta, fue el que tuvo menor pérdida de peso frente a los tres grupos que recibieron el antibiótico pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En relación a la presencia de otorrea, el tratamiento con el antibiótico no influyó en su presentación, ya que tanto en el grupo A, que no recibió antibiótico, como en el D, que fue tratado solo con amoxicilina, todos los animales mostraron otorrea. En los grupos tratados con ibuprofeno, B y C, así como en el grupo de la combinación del antibiótico con la dosis baja de ibuprofeno, E, uno, dos y un oído no mostraron otorrea, respectivamente. El grupo F (amoxicilina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno), registró el menor número de casos de otorrea, aunque no hubo diferencias significativas frente al resto de los grupos.

Respecto al número de oídos con cultivo positivo, de los grupos que no se trataron con amoxicilina, todos los oídos del grupo A tuvieron cultivos positivos para la bacteria, pero en los grupos B y C, que recibieron ibuprofeno, se registraron tres y un caso negativo, respectivamente. En los grupos D, E y F, que recibieron amoxicilina, solo hubo un oído con cultivo negativo cuando se administró el antibiótico solo. En los grupos E y F, donde los animales recibían amoxicilina con ibuprofeno se redujo ligeramente el número de oídos con cultivo positivo, pero las diferencias no fueron significativas frente al resto de los grupos.

Los recuentos bacterianos en los grupos A, B y C, sin tratamiento antibiótico, fueron mayores en el grupo A, que no recibió ibuprofeno, aunque no se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos. Los grupos D, E y F, tratados con amoxicilina registraron los menores recuentos bacterianos. Mientras que la administración de amoxicilina sola en el grupo D fue significativa frente al grupo control A, la combinación de amoxicilina con ibuprofeno en los grupos E y F produjo una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de los recuentos bacterianos frente a todos los grupos que no recibieron el antibiótico. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos que recibieron el antibiótico.

Los recuentos de PMN también fueron menores en los grupos E y F, que se trataron con el antibiótico asociado a ibuprofeno, aunque no se registraron diferencias significativas cuando se compararon los tres grupos que recibieron el antibiótico entre sí.

De los 6 parámetros estudiados, se obtuvieron mejores resultados en los grupos que recibieron ibuprofeno asociado al antibiótico, sobre todo en el grupo F, que recibió la dosis de ibuprofeno más alta.

La comparación de ambos regímenes de tratamiento mostró que la administración precoz con una sola dosis a las 5 horas p.i. resultó más eficaz que la tardía con 5 dosis a partir de las 18 horas p.i., obteniéndose mejores resultados en todos los parámetros de estudio.

2.3.2. Valoración de la eficacia de eritromicina sola o asociada a ibuprofeno.

2.3.2.1. Eficacia de un tratamiento precoz con una dosis única.

En la figura 19 se muestran los resultados otoscópicos obtenidos en cada grupo para el régimen de una dosis de eritromicina y/o ibuprofeno a las 5 h p.i., tras la inoculación de $6,23 \pm 0,60 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído de } S. \textit{pneumoniae}$ FJD 60.

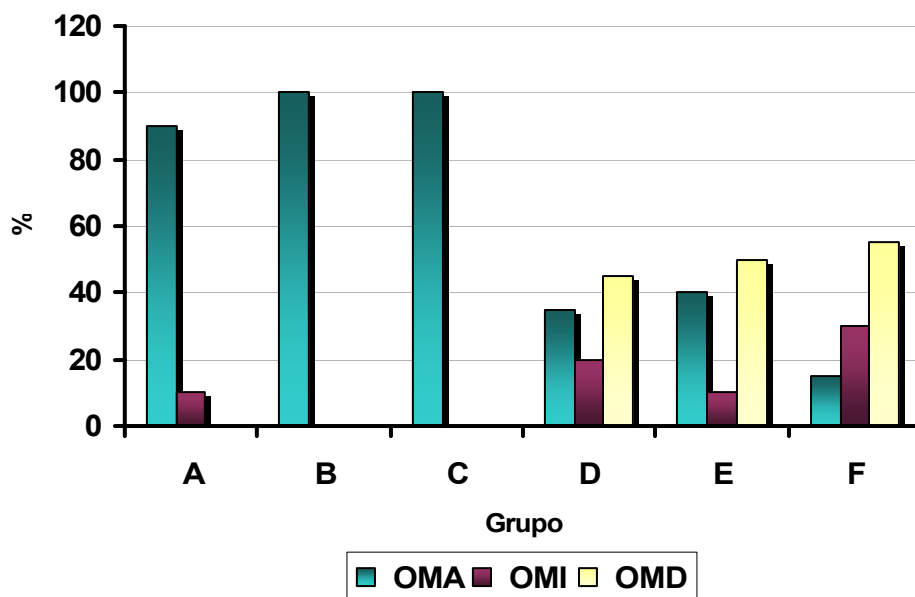


Figura 19. Resultados otoscópicos (%) obtenidos a las 48 h p.i. Las letras designan el grupo de estudio y la posología de los fármacos se indica por dosis : A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno , y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

En los grupos A, B y C, que no recibieron eritromicina, el 90 % o más de los oídos presentaron OMA.

En los grupos D, E y F, tratados con eritromicina, se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en los casos de OMA frente a los grupos que no recibieron el antibiótico, así como un aumento de los casos de OMD. Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo F (eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno) donde la exploración otoscópica a las 48 horas reveló solo un 15 % de oídos con OMA, aunque no se registraron diferencias significativas con los grupos D y E.

En la tabla 13 se muestran los datos obtenidos en cada grupo para el resto de los parámetros.

Tabla 13. Eficacia de 5 mg/kg de eritromicina administrada sola o combinada con 2,5 o 7,5 mg/kg de ibuprofeno a las 5 h p.i.

GRUPO	PORCENTAJE			RECUELTOS BACTERIANOS	RECUELTOS DE PMN
	PÉRDIDA DE PESO (Media ± D.E.)	OÍDOS CON OTORREA	OÍDOS CON CULTIVO POSITIVO	Log ₁₀ ufc/20 µl (Media ± D.E)	(Media ± D.E.)
A	11,85 ± 3,57	95	100	3,42 ± 0,60	4,46 ± 3,84
B	13,73 ± 3,60	100	95	3,17 ± 0,89	5,07 ± 2,26
C	14,71 ± 1,26	100	100	3,65 ± 0,50	6,65 ± 4,62
D	6,61 ± 4,87 ¹	65 ¹	65 ¹	1,81 ± 1,35 ¹	2,06 ± 2,04 ¹
E	6,01 ± 3,27 ¹	75 ¹	75 ¹	1,87 ± 1,15 ¹	2,92 ± 3,41 ¹
F	5,08 ± 2,81 ¹	70 ¹	70 ¹	1,39 ± 0,93 ¹	2,16 ± 1,81 ¹

¹. Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) frente a los animales no tratados con el antibiótico (A, B y C).

Las letras designan el grupo de estudio: A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno, y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

Los animales de los grupos A, B y C, que no recibieron eritromicina, experimentaron la mayor pérdida de peso y no se hallaron diferencias significativas entre ellos. El tratamiento con eritromicina en los grupos D, E y F, redujo significativamente ($p \leq 0,05$) la pérdida de peso frente a los grupos que no se trataron con el antibiótico. Los grupos E y F, que recibieron eritromicina asociada a ibuprofeno fueron los que reportaron una menor pérdida de peso, aunque las diferencias entre los tres grupos que recibieron eritromicina no fueron significativas.

Respecto a la presencia de otorrea y en los grupos sin tratamiento antibiótico, aunque en el grupo control A hubo un oído de un animal donde no se observó otorrea, todos los oídos en los grupos B y C, tratados con ibuprofeno, la presentaron. No hubo diferencias entre los tres grupos. En los grupos tratados con eritromicina, D, E y F, se redujeron significativamente ($p \leq 0,05$) los porcentajes de otorrea cuando se compararon con los grupos sin antibiótico, pero no se observaron diferencias significativas cuando se compararon entre sí.

Todos los oídos de los grupos A (control) y C (7,5 mg/kg de ibuprofeno) presentaron cultivo positivo, mientras que en el grupo B (2,5 mg/kg de ibuprofeno), el cultivo de la muestra de un oído fue negativo. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos que recibieron el antibiótico. El tratamiento con eritromicina redujo significativamente ($p \leq 0,05$) el número de oídos con cultivo positivo en los grupos D, E y F respecto a los grupos que no recibieron el antibiótico, pero no se hallaron diferencias entre ellos.

Respecto a los recuentos bacterianos, no hubo diferencias significativas entre los grupos A, B y C, que no recibieron el antibiótico. Se observó una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en los grupos D, E y F, que recibieron eritromicina, frente a los que no la recibieron. Aunque los menores recuentos se obtuvieron en el grupo F, que recibió el antibiótico asociado a la dosis más alta de ibuprofeno, no se hallaron diferencias entre los tres grupos con tratamiento.

La administración del antibiótico también redujo significativamente ($p \leq 0,05$) los recuentos de PMN. Tampoco se hallaron diferencias entre los tres grupos sin tratamiento antibiótico así como entre los tres grupos con tratamiento.

En la mayoría de los parámetros estudiados, los mejores resultados se obtuvieron en el grupo F que recibía eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

2.3.2.2. Eficacia de un tratamiento tardío con dosis múltiples.

En la figura 20 se muestran los resultados otoscópicos obtenidos en cada grupo para el régimen de 5 dosis de eritromicina y/o ibuprofeno a las 18, 21, 24, 27 y 30 h p.i., tras la inoculación de $6,36 \pm 0,21 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/oído de } S. \text{pneumoniae FJD 60}$.

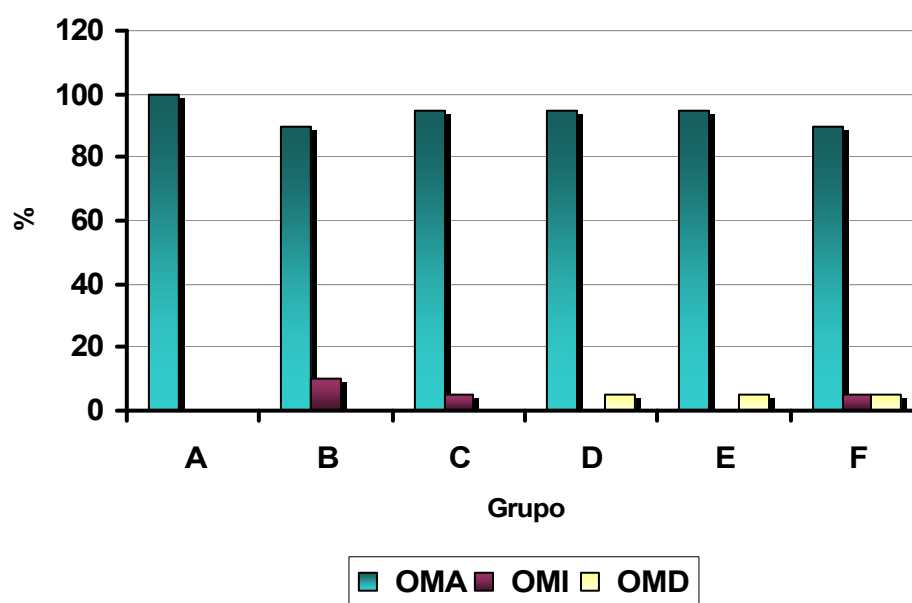


Figura 20. Resultados otoscópicos (%) obtenidos a las 48 h p.i. Las letras designan el grupo de estudio y la posología de los fármacos se indica por dosis : A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno , y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

Todos los animales del grupo A (control) desarrollaron OMA. En los grupos B y C, que no recibieron eritromicina pero se trataron con ibuprofeno se registraron dos casos y un caso de OMI, respectivamente.

Respecto a los grupos D, E y F, que se trataron con eritromicina, no hubo diferencias frente a los animales que no se trataron con el antibiótico. Se registraron un oído con OMD en el grupo D (eritromicina sola), un oído con OMD en el grupo E (eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno) y dos oídos, uno con OMI y otro con OMD en el grupo F (eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno). No hubo diferencias entre los tres grupos que recibieron el antibiótico.

En la tabla 14 se muestran los datos obtenidos en cada grupo respecto al régimen de tratamiento tardío con eritromicina

Tabla 14. Eficacia de 5 mg/kg de eritromicina administrada sola o combinada con 2,5 o 7,5 mg/kg de ibuprofeno en 5 dosis las 18, 21, 24, 27 y 30 h p.i.

GRUPO	PORCENTAJE		RECUELTOS BACTERIALES Log ₁₀ ufc/20 µl (Media ± D.E.)	RECUELTOS DE PMN (Media ± D.E.)
	PÉRDIDA DE PESO (Media ± D.E.)	OÍDOS CON OTORREA	OÍDOS CON CULTIVO POSITIVO	
A	11,67 ± 2,82	100	95	4,11 ± 0,75
B	10,13 ± 4,03	95	80	2,30 ± 1,17
C	8,67 ± 3,08	80	100	3,47 ± 2,33
D	8,23 ± 1,71 ²	100	95	3,19 ± 1,71
E	8,18 ± 3,21 ²	95	80	2,03 ± 1,69
F	5,60 ± 2,58 ³	100	75	2,17 ± 1,87

¹. Indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) frente a los animales no tratados con el antibiótico (A, B y C).

². Indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) frente al grupo A (control) y el B (2,5 mg/kg de ibuprofeno).

³. Indica diferencias significativas (p ≤ 0,05) frente a todos los grupos excepto el E (eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno).

Las letras designan el grupo de estudio: A) Control, B) Grupo tratado con 2,5 mg/kg de ibuprofeno, C) Grupo tratado con 7,5 mg/kg de ibuprofeno, D) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina, E) Grupo tratado con 5 mg/kg de eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno, y F) Grupo tratado con de 5 mg/kg de eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno.

De los tres grupos que no se trataron con eritromicina, A, B y C, los animales de los grupos A (control) y B (2,5 mg/kg de ibuprofeno) experimentaron la mayor pérdida de peso. En el grupo C (7,5 mg/kg de ibuprofeno) los resultados obtenidos fueron menores, pero no hubo diferencias significativas entre los tres grupos. En los grupos que se trataron con eritromicina, D (eritromicina sola) y E (eritromicina y 2,5 mg/kg de ibuprofeno) registraron una menor pérdida de peso que resultó significativa (p ≤ 0,05) cuando se compararon tanto con el grupo A (control) como con el grupo B (2,5 mg/kg de ibuprofeno).

La menor reducción en el peso se obtuvo en el grupo F (eritromicina y 7,5 mg/kg de ibuprofeno) y esta fue significativa ($p \leq 0,05$) en la comparación con todos los grupos excepto el E.

Los porcentajes de otorrea no registraron diferencias entre los distintos grupos. En los grupos que no recibieron el antibiótico, un oído en el grupo B y dos en el grupo C no presentaron otorrea. En los grupos tratados con el antibiótico hubo un oído sin otorrea en el grupo E.

Respecto al número de oídos con cultivo positivo no se observaron diferencias significativas entre los 6 grupos, aunque fue el grupo F, tratado con eritromicina asociada a 7,5 mg/kg de ibuprofeno el que registró el menor porcentaje de oídos con cultivo positivo.

En relación a los recuentos bacterianos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos A, B y C, que no se trataron con eritromicina. La combinación de ibuprofeno con eritromicina en los grupos E y F produjo una reducción significativa ($p \leq 0,05$) del número de recuentos bacterianos frente a los grupos que no recibieron antibiótico. No se hallaron diferencias significativas entre ellos y tampoco respecto al grupo D, que recibió eritromicina sola.

Respecto a los recuentos de PMN, no se observaron diferencias significativas entre los 6 grupos de estudio, aunque fueron los grupos E y F, que recibieron eritromicina asociada a ibuprofeno los que registraron un menor número de PMN frente al resto de los grupos.

De los 6 parámetros estudiados, los mejores resultados se obtuvieron en los grupos E y F, que combinaron eritromicina con ibuprofeno.

La comparación de ambos regímenes de tratamiento demostró que, nuevamente, la administración precoz del antibiótico en una sola dosis a las 5 h p.i., resultó más eficaz que cinco dosis administradas a partir de las 18 h p.i. Los grupos de que combinaron antibiótico e ibuprofeno registraron las tasas de mejoría más elevadas en ambos regímenes frente al resto de los grupos y en general.

V. DISCUSIÓN.

S. pneumoniae es un microorganismo frecuente en el tracto respiratorio (Leiberman A *et al* 1999) y la causa principal de neumonía, meningitis, OMA y sinusitis (Musher DM, 2000). Se sabe que para que se produzca enfermedad neumocócica debe existir una colonización asintomática previa de la bacteria en el tracto respiratorio (Moscoso M *et al* 2006), lo que conlleva que *S. pneumoniae* se adhiera sobre las mucosas y el epitelio respiratorio. La adherencia de un microorganismo a una superficie es un paso previo al establecimiento de biopelículas o biocapas bacterianas (Palmer J *et al* 2007, Vila J *et al* 2008) y se ha visto que estas estructuras desempeñan un importante papel al garantizar la supervivencia de las bacterias en la superficie de las mucosas (Vila J *et al* 2008) y por tanto, su persistencia en el tracto nasofaríngeo y las vías respiratorias bajas (Plotkowsky MC *et al* 1993, Monso E *et al* 1995).

La OMA es una enfermedad de elevada prevalencia en la población infantil (Pereira MB and Ramos BD 1998, Rovers MM *et al* 2004), y *S. pneumoniae* es la bacteria aislada con mayor frecuencia en niños con OMA (AAP & AAFP 2004). La OMA neumocócica tiene un bajo porcentaje de resolución espontánea (Gala López Gozález *et al* 2006, del Castillo F *et al* 2007) y se pueden presentar episodios recurrentes tras el tratamiento de un caso agudo, OMD residual y en el peor de los casos, establecerse una OMC, por lo que el conocimiento de los mecanismos implicados en su patogenia resulta esencial a la hora de abordar el tratamiento de la enfermedad.

Las dos cepas bacterianas incluidas en el estudio, *S. pneumoniae* FJD 60 y *S. pneumoniae* AR 09164, son cepas poco capsuladas y resistentes a penicilina, según los actuales puntos de corte establecidos para este antibiótico (CLSI 2006) y ambas se seleccionaron por pertenecer a dos de los serotipos implicados con mayor frecuencia en la OMA, el 23 F y el 9V (http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF, Picazo JJ *et al* 2003) respectivamente. Para llevar a cabo el estudio de ambas cepas de *S. pneumoniae*, elegimos dos antibióticos con distinto mecanismo de acción, amoxicilina (betalactámico) y eritromicina (macrólido), ambos fármacos indicados en el tratamiento antimicrobiano de la OMA (AAP & AAFP 2004). Los datos obtenidos en los ensayos de determinación de la CMI mostraron que, aunque ambas cepas fueron sensibles a eritromicina (CMI = 0,12 µg/mL), *S. pneumoniae* FJD 60 fue sensible a amoxicilina (CMI = 1 µg/mL), pero no así *S. pneumoniae* AR 09164 (CMI = 8 µg/mL), por lo que se seleccionó la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 para continuar con el resto de estudios de sensibilidad antimicrobiana y valorar la eficacia de estos dos antibióticos en el modelo experimental.

Ibuprofeno es un anti-inflamatorio de naturaleza no esteroidea (NSAID) de uso común en el tratamiento sintomático de la OMA (AAP & AAFP 2004) del que se ha sugerido cierta acción antimicrobiana frente a bacterias gram positivas (Elvers KT and Wright SJ 1995). En los estudios *in vitro* observamos que ibuprofeno inhibía el crecimiento de *S. pneumoniae* FJD 60 a concentraciones mayores o iguales a 256 µg/mL y su CMI se determinó en 1024 µg/mL. Nuestros datos acerca del efecto inhibitor de ibuprofeno concuerdan con el estudio de Elvers, que se refiere a concentraciones de ibuprofeno mayores de 150 µg/mL para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, y por otro lado los resultados de la determinación de la CMI de ibuprofeno, se asemejan a los obtenidos con experiencias previamente descritas en *Candida albicans* (Pina Vaz C *et al* 2000). En nuestro trabajo también se contempla el efecto de la asociación de este anti-inflamatorio con amoxicilina y/o eritromicina, puesto que se ha observado *in vitro* efecto sinérgico en la asociación de ibuprofeno con fluconazol frente a *C. albicans* (Scott EM *et al* 1995, Pina Vaz C *et al* 2000) e *in vivo* en un tratamiento de OMA con ibuprofeno y ampicilina (Diven WF *et al* 1995). Por lo que respecta a nuestros datos, los valores FIC_T obtenidos de la asociación de ibuprofeno con cada antibiótico ($1,02 \pm 0,02$ para la combinación de ibuprofeno + amoxicilina y $0,86 \pm 0,26$ para la combinación de ibuprofeno + eritromicina) indican que, aunque tanto con amoxicilina como con eritromicina el efecto de la asociación es indiferente, en ambos casos se encuentra próximo a la sinergia.

La influencia del medio, de la fase de crecimiento del inóculo bacteriano sobre la actividad de los antibióticos empleados, la metodología empleada y posteriormente, el efecto de la asociación de cada antibiótico con ibuprofeno a lo largo del tiempo se evaluaron mediante la realización de curvas de mortalidad. Amoxicilina y eritromicina se estudiaron a concentraciones de 5 y 0,6 µg/mL, respectivamente, que se corresponden con 5 veces la CMI para dicha cepa y equivalen a la concentración alcanzada por cada antibiótico en el oído medio tras la administración de una dosis de 5 mg/kg a gerbos con una OMA experimental inducida por la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60.

En el estudio de actividad empleamos dos medios distintos (PBS, carente de nutrientes y THB, medio rico) y tres condiciones experimentales diferentes (inóculo en suspensión equiparable a una fase de crecimiento estacionaria, inóculo en fase de crecimiento logarítmica añadido al mismo tiempo que el antibiótico o fase exponencial I e inóculo en fase de crecimiento logarítmica al que se le añadió el antibiótico o fase exponencial II). Los resultados obtenidos a las 6 horas de incubación mostraron que la actividad de ambos antibióticos disminuía cuando: 1) la bacteria se añadía a un medio sin nutrientes como el PBS, 2) se añadía un inóculo a partir de una suspensión y 3) si añadíamos el

antibiótico sobre un inóculo en crecimiento (fase exponencial II) en lugar de añadir el inóculo en crecimiento al medio con el antibiótico (fase exponencial I). Por otro lado, amoxicilina fue más activa que eritromicina frente a inóculos en condiciones de suspensión o fase exponencial I. Los mejores resultados se obtuvieron con amoxicilina en THB frente a un inóculo en fase exponencial I ya que a las 6 horas de incubación se observó efecto bactericida (reducción $> 3 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/mL}$) de este antibiótico cuando se ensayaba bajo estas condiciones. Sin embargo, la actividad de la amoxicilina disminuyó en el caso de fase exponencial II, siendo esta menor incluso que la obtenida frente al inóculo en suspensión.

Nuestros datos muestran que el efecto bactericida de amoxicilina y eritromicina depende, tanto del medio, como de la fase de crecimiento en que se encuentre el inóculo o de la metodología empleada, y que este es mayor sobre microorganismos en fase de crecimiento exponencial que se añaden a un medio con antibiótico. Respecto a amoxicilina, nuestros resultados se correlacionan con el mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos (García-Rodríguez JA and Martin IT 1998). Aunque algunos autores no han hallado diferencias significativas en la eficacia de penicilinas frente a inóculos en fase de crecimiento exponencial y en fase estacionaria (Knudsen JD *et al* 1998), en otros trabajos sí se ha observado una mayor actividad bactericida cuando el antibiótico se enfrenta a bacterias en fase activa de crecimiento (Steven DL *et al* 1992). Respecto a eritromicina, existe una buena correspondencia entre nuestros datos y los efectos descritos en la literatura, ya que este antibiótico puede actuar como agente bactericida y agente bacteriostático (Mensa J *et al* 2003).

Seguidamente, se seleccionaron las condiciones en las que los antibióticos resultaban más activos (THB, inóculo bacteriano en fase exponencial I) para estudiar el efecto de la asociación de amoxicilina o eritromicina (a 5 veces su CMI) con ibuprofeno frente a la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60. Ibuprofeno se estudió a dos concentraciones, una baja de 4 $\mu\text{g/mL}$ y una alta de 128 $\mu\text{g/mL}$, puesto que no se deseaba que inhibiera el crecimiento bacteriano. A las 6 horas de incubación, no hubo diferencias entre las reducciones en los recuentos bacterianos causadas por amoxicilina o eritromicina solas y las observadas en las asociaciones de sendos antibióticos con cada una de las concentraciones de ibuprofeno estudiadas. Los datos obtenidos en nuestros ensayos sugieren que ibuprofeno a concentraciones de 4 y 128 $\mu\text{g/mL}$, no modifica la actividad de amoxicilina y eritromicina frente a *S. pneumoniae* FJD 60 cuando se asocia a dichos antibióticos.

El estudio de la adherencia bacteriana *in vitro* incluyó estudios de la capacidad adherente y de formación de biopelículas, atendiendo a la definición que Donlan y Costerton establecen para biopelícula (Donlan RM and Costerton JW 2002). La interacción inicial de la bacteria con una superficie sólida está condicionada por una multitud de factores referidos tanto a la superficie -como son el material, la carga, la capacidad de adsorción de moléculas orgánicas, la hidrofobicidad y la micro-topografía de la misma- (Palmer J *et al* 2007), como a la existencia de nutrientes en el medio (Moscoso M *et al* 2006) o la presencia de estructuras bacterianas con función adhesina (Vila J *et al* 2008). La importancia de estos hallazgos en relación con la patogenia de la OM radica en que se ha sugerido que la adherencia de *S. pneumoniae* a superficies inertes podría contribuir a la persistencia del neumococo en otitis medias asociadas a la implantación de tubos de timpanostomía (Ah-Tye C *et al* 2001, Post JC 2001).

Los estudios de la capacidad adherente de las dos cepas de *S. pneumoniae*, FJD 60 y AR 09164, se realizaron empleando como superficie placas de poliestireno con fondo plano debido a la facilidad de *S. pneumoniae* para formar biocapas sobre este material (Moscoso M *et al* 2006) y como medio, MHB II, pobre para las condiciones de crecimiento requeridas por *S. pneumoniae*. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, se evaluó la adherencia a poliestireno de ambas cepas mediante dos técnicas (rascado y sonicación) que diferían respecto al tiempo de incubación de la bacteria (2 y 1 horas, respectivamente) y el modo de procesamiento del material adherido. Tras estos tiempos de incubación, la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 (serotipo 23 F) presentó una gran capacidad de adherencia sobre poliestireno, mientras que *S. pneumoniae* AR 09164 (serotipo 9V) apenas se adhirió sobre este material y hubo buena correlación entre los datos obtenidos cuando se compararon ambas técnicas. Puesto que las condiciones experimentales fueron las mismas para ambas bacterias y el tamaño del inóculo empleado, similar, suponemos que las diferencias halladas en la capacidad adherente son intrínsecas de cada cepa, y podrían ser debidas, entre otras causas, a diferencias estructurales en la cápsula neumocócica (Kamerling JP 2000, Hammerschmidt S *et al* 2005) y en las proteínas de superficie.

La cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 se seleccionó para los estudios de adherencia en presencia de fármacos debido a su elevada capacidad de adhesión sobre poliestireno. Ibuprofeno a concentraciones de 4 y 128 µg/mL produjo una reducción de la capacidad adherente de la bacteria, y la correlación de los resultados obtenidos tanto por rascado, como por sonicación, fue buena, por lo que descartamos posibles variaciones derivadas de la inclusión del fármaco. Este efecto inhibitorio del ibuprofeno sobre la adherencia que hemos observado *in vitro* con *S. pneumoniae* FJD 60 ya sido previamente descrito por Alem y colaboradores, que han señalado cierta capacidad de este anti-inflamatorio para inhibir la formación de biopelículas de *C. albicans* (Alem MA and Douglas J 2004).

En el estudio del impacto de los antibióticos solos o asociados a ibuprofeno sobre la adherencia de *S. pneumoniae* FJD 60 se emplearon concentraciones de amoxicilina y eritromicina a 1/4 y 1/8 de su CMI con la concentración de 128 µg/mL de ibuprofeno, que fue la que consiguió mejores resultados a la hora de inhibir la adherencia bacteriana. En este caso, los ensayos se realizaron únicamente por la técnica de rascado. Nuestros datos indican que, en presencia de concentraciones de amoxicilina por debajo de su CMI, la capacidad la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 para adherirse sobre poliestireno disminuía y que este fenómeno se potenciaba ligeramente cuando combinábamos el antibiótico con ibuprofeno. Sin embargo eritromicina aumentó ligeramente la capacidad adherente de la bacteria a las concentraciones empleadas, si bien es cierto que se apreció una ligera disminución cuando se combinó con ibuprofeno. Teniendo en cuenta que ninguna de las concentraciones empleadas de cada antibiótico inhibió el crecimiento de la bacteria (datos no mostrados), los resultados referidos a la eritromicina, resultan en principio, contradictorios con el estudio de Kondon y Hashiba, que habían observado inhibición de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de este antibiótico a 1/20 de su CMI (Kondon K and Hashiba 1998). Una posible explicación de esta discrepancia sería que estamos trabajando con un microorganismo distinto (*S. pneumoniae*) y durante el proceso de adherencia previa al establecimiento de una biopelícula. Respecto a estas consideraciones, la disminución de la capacidad adherente de *S. pneumoniae* FJD 60 observada con estas concentraciones de amoxicilina podría ser debida, al menos durante el proceso de adherencia inicial, a efectos derivados del mecanismo de acción de este antibiótico y que podrían afectar a la superficie bacteriana, donde se han descrito varias moléculas y estructuras implicadas en los procesos de adherencia (Jedrezjas MJ *et al* 2001, Barocchi MA *et al* 2006, Moscoso M *et al* 2006), mientras que eritromicina, que inhibe la síntesis proteica, no afectaría a la superficie de la bacteria y por tanto tampoco a su capacidad adherente.

Experimentalmente, neumococo es capaz de constituir biopelículas *in vitro* (Donlan RM *et al* 2004, Allegrucci M *et al* 2006, Moscoso M *et al* 2006). Estudiamos la capacidad de ambas cepas de *S. pneumoniae* para formar biopelículas sobre poliestireno tras 16 y 24 horas de incubación. Al no emplear cultivos continuos y con el objeto de ralentizar el crecimiento de estas bacterias, sembramos inóculos de pequeño tamaño en un medio con nutrientes pero no óptimo para una bacteria exigente como neumococo, ya que parece que la formación de biopelículas se ve favorecida en medios no demasiado ricos (Moscoso M *et al* 2006). Los resultados obtenidos tras realizar una medida indirecta de la biopelícula empleando un método colorimétrico con cristal violeta (Peeters E *et al* 2007, Moscoso M *et al* 2006, Naves P *et al* 2008), muestran que ambas cepas fueron capaces de establecer sendas biopelículas a las 16 y 24 horas de incubación, y a las 24 horas estas fueron mayores. En ambos casos, *S. pneumoniae* FJD 60 fue mejor formador de biopelícula. Por otro lado, la viabilidad de las bacterias planctónicas y adheridas en la biopelícula de cada cepa disminuyó a las 24 horas de incubación, con un menor nº de recuentos bacterianos que a las 16 horas. Cuando comparamos las proporciones de bacterias adheridas/bacterias planctónicas obtenidas por cada cepa, observamos que estas fueron prácticamente los mismo a las 16 y 24 horas de incubación (de 80,1 y 85 % con *S. pneumoniae* FJD 60 y de 66% con *S. pneumoniae* AR 09164 para 16 y 24 horas de incubación, respectivamente), obteniéndose el mayor índice con la cepa *S. pneumoniae* FJD 60 incubada a las 24 horas. Nuestros datos sugieren que, aunque a las 24 horas se produce un descenso en la viabilidad tanto de las bacterias planctónicas como adheridas en biopelícula, las proporciones entre ambas poblaciones bacterianas se mantienen respecto a las 16 horas y la biopelícula formada es mayor que la obtenida a las 16 horas. Por otro lado, el mayor índice de bacterias adheridas obtenidas por *S. pneumoniae* FJD 60 y los resultados de la medida indirecta de la biopelícula indicarían que esta bacteria es más eficiente a la hora de constituir una biopelícula y posiblemente, más virulenta.

Seleccionamos las mejores condiciones para establecer una biopelícula neumocócica (incubación de *S. pneumoniae* FJD 60 sobre poliestireno durante 24 horas) en presencia de distintas concentraciones de ibuprofeno, y observamos que, aunque ibuprofeno no afectaba al crecimiento bacteriano en un rango de concentración comprendido entre 0,25-128 µg/mL (datos no mostrados), sí producía una reducción de la biopelícula, y de forma significativa a partir de 4 µg/mL. Además, la visualización por microscopía confocal de una biopelícula formada por esta cepa en presencia de 128 µg/mL de ibuprofeno permitió apreciar cambios en el nº, distribución y morfología de las microcolonias en la biopelícula. Estos resultados, son concordantes con los datos obtenidos en nuestro estudio de la

adherencia de esta cepa y con otros trabajos que indican la capacidad del ibuprofeno para inhibir la formación de biopelículas (Alem MA and Douglas J 2004, Lawrence JR *et al* 2005).

Por lo que respecta a los experimentos *in vivo*, para el estudio de la OMA, se empleó un modelo experimental en gerbos a partir de la adaptación que Fulghum y colaboradores (Fulghum RS *et al* 1982) realizaron del modelo en chinchillas propuesto originalmente por Giebink y colaboradores (Giebink GS *et al* 1976). Empleando este modelo experimental de OMA en gerbos en estudios previos hemos podido inducir una infección bacteriana (demostrada tanto por los hallazgos otoscópicos, como por la presencia de bacterias y PMN en el líquido del oído medio) y por otro lado, comparar la eficacia bacteriológica de distintos antibióticos antes de que la bacteria comience a eliminarse de forma espontánea (Cenjor C *et al* 1998, Ponte C *et al* 2003, Parra A *et al* 2002, Parra A *et al* 2004)

Tanto *S. pneumoniae* FJD 60 como *S. pneumoniae* AR 09164 indujeron OMA en los animales tras su inoculación, y aunque no se ha establecido previamente relación entre adherencia a poliestireno y virulencia *in vivo*, los resultados obtenidos tras la evaluación de los parámetros (% de OMA observada, % de pérdida de peso, % de otorrea, % de n° de oídos con cultivo positivo, recuentos bacterianos y recuentos de PMN) muestran claramente que *S. pneumoniae* FJD 60, una bacteria que ha demostrado una mayor capacidad para adherirse y formar biopelículas *in vitro*, es capaz de provocar una OMA más severa *in vivo* que la cepa AR 09164, mucho menos adherente. Estos hallazgos apoyan la teoría que propone dos fases en el proceso de adherencia bacteriana sobre las células epiteliales, la primera, una fase inicial mediada por interacciones fisicoquímicas y la segunda, una fase tardía mediada por procesos de interacción moleculares y celulares en el que intervienen componentes de la bacteria y cuya implicación en la severidad de la afección podría ser debida a las respuestas inmunológicas y no inmunológicas que el establecimiento de estas dos fases inducen en el hospedador (Moscoso M *et al* 2006).

Seleccionamos la cepa de *S. pneumoniae* FJD 60 para posteriores estudios debido a su mayor virulencia. En la evaluación de la OMA inducida por esta cepa se observó que la perforación de la membrana timpánica tenía lugar a partir de las 5 horas p.i., (aspecto que se consideró para establecer los tiempos de administración del tratamiento en los estudios de eficacia) y que la enfermedad ya había comenzado a resolverse espontáneamente a las 67 horas p.i. (mejoría en los parámetros estudiados y aparición de OMI y OMD junto con OMA) por lo que la evaluación de los parámetros se realizó a las 24 y 48 horas p.i.

Respecto a los estudios con antimicrobianos, se empleó una dosis de 5 mg/kg de amoxicilina o eritromicina ya que para ambos casos, se alcanzan concentraciones en el suero y el oído medio de gerbos similares a las obtenidas con niños que reciben las dosis estándar para el tratamiento de la OMA (Krause PJ *et al* 1991, Nelson CT *et al* 1994, Craig WA and Andes D 1996, Barry B *et al* 1997). En el caso de ibuprofeno, se emplearon una dosis baja y una dosis alta (de 2,5 y 7,5 mg/kg, respectivamente) para observar la respuesta provocada por este fármaco, ya que se ha descrito un efecto paradójico en modelos experimentales, donde ibuprofeno actuaría como agente pro-inflamatorio a dosis bajas (Jungkeit MC and Chole RA 1991).

La administración de una dosis única de 5 mg/kg de amoxicilina o eritromicina 5 horas después de la inoculación bacteriana, mejoró significativamente todos los parámetros evaluados en comparación con el grupo control. Sin embargo, el retraso en el tratamiento hasta las 18 horas p.i. supuso una disminución importante de la eficacia clínica, otoscópica y bacteriológica y donde solo se observó cierta mejoría respecto al % de la pérdida de peso. Los buenos resultados obtenidos con el tratamiento precoz se explican teniendo en cuenta: 1) que la cepa es sensible a ambos antibióticos y 2) que la farmacocinética y la farmacodinamia de estos antibióticos son favorables tanto en el suero (Cenjor C *et al* 1998, Parra A *et al* 2002) como en el oído medio.

La disminución de la eficacia de amoxicilina y eritromicina en una infección inducida por *S. pneumoniae* FJD 60, una cepa sensible a ambos antibióticos tras el retraso del tratamiento no se puede explicar por la aparición de resistencias, ya que los aislados obtenidos en las muestras de exudado de animales control presentaban la misma sensibilidad para ambos antibióticos. Tampoco se puede atribuir a una mayor carga bacteriana, ya que esta es prácticamente igual a las 5 y las 18 horas p.i. El efecto observado podría ser debido a varias causas. En primer lugar, hay que tener en cuenta las diferencias en la farmacodinamia entre la administración de un tratamiento precoz con una única dosis o un tratamiento tardío con 5 dosis y que podrían deberse a la remisión de la respuesta inflamatoria en el oído medio, que parece ser un factor importante para la penetración del antibiótico (Diven WF *et al* 1995). También se ha sugerido la influencia de la fase metabólica en la que se encuentre la bacteria (Eagle H 1949) al observarse un descenso de la eficacia antimicrobiana frente a bacterias en fase de crecimiento estacionaria (Gerber AU *et al* 1993). Atendiendo a estas observaciones, podemos explicar la disminución de la eficacia antimicrobiana correlativamente con los resultados obtenidos en los estudios de actividad *in vitro*. Así, durante las primeras 5 horas tras la inoculación, las bacterias se encontrarían en fase de crecimiento exponencial y el antibiótico sería más

eficaz, mientras que a las 18 horas p.i., las bacterias se hallarían en una fase estacionaria tardía y la eficacia del antibiótico disminuiría. Por último, hay que tener en cuenta los fenómenos de adherencia y la formación de biopelículas en el oído medio. Post, Ehrlich y colaboradores han observado y demostrado presencia de biocapas de *H. influenzae* sobre la mucosa del oído medio de chinchillas con OMD (Post JC 2001, Ehrlich GD *et al* 2002). En un estudio más actual, Hall – Stoodley y colaboradores han logrado visualizar biopelículas constituidas por los principales agentes etiológicos bacterianos de la OMA sobre la mucosa del oído medio de niños con OMC, sugiriendo una mayor prevalencia de *S. pneumoniae* en OMCs y señalan la implicación de estas biopelículas en la patogenia y cronificación de una OMD (Hall – Stoodley L *et al* 2006). Un aspecto relevante a tener en cuenta sería el papel que desempeñan las biopelículas como formas de resistencia ante agentes antimicrobianos, desinfectantes y germicidas (Rodríguez-Martínez JM and Pascual A 2008). Para ejercer su acción, el antibiótico tiene que ser capaz de penetrar en la biopelícula, lo que depende de la estructura de la biopelícula, así como de las características bioquímicas de la matriz que se establece alrededor de la biopelícula. Además, existen diferencias en la capacidad de penetración de los antibióticos (Bdi-Alí A *et al* 2006). La eficacia disminuida de los antibióticos en un régimen de tratamiento tardío, también podría deberse presencia de estas biopelículas., ya que la formación de microcolonias típicas de una biopelícula temprana se puede apreciar a las 24 horas después de la infección (Ehrlich GD *et al* 2002) y experimentalmente, nosotros hemos conseguido demostrar presencia de biopelícula *in vitro* tras 16 y 24 horas de incubación.

La combinación de amoxicilina con ibuprofeno resultó más eficaz que el tratamiento con el antibiótico solo, ya que mejoró todos los parámetros estudiados en el régimen de tratamiento precoz y disminuyó los recuentos bacterianos en el régimen de tratamiento tardío, si bien no se halló significado estadístico. Además, estos resultados fueron mejores cuando el anti-inflamatorio se administraba en una dosis más alta. Nuestros datos sugieren que el empleo de ibuprofeno conjuntamente con amoxicilina resulta favorable tanto si el antibiótico se administra de forma precoz o tardía.

También, en el caso de eritromicina la administración conjunta del antibiótico con ibuprofeno, sobre todo con el anti-inflamatorio a dosis altas, mejoró los resultados conseguidos por eritromicina sola, tanto en administración precoz como tardía. La combinación de eritromicina con la dosis alta de ibuprofeno causó una disminución de los recuentos bacterianos en ambos regímenes de tratamiento y mejoró todos los parámetros cuando se administró precozmente, aunque no se halló significación estadística. Los efectos más notorios de esta combinación los hallamos respecto a la pérdida de peso en

animales adscritos al régimen de tratamiento tardío, ya que la reducción observada en este parámetro también fue estadísticamente significativa frente al tratamiento con el antibiótico solo. No obstante, hemos de ser prudentes con este último resultado, que podría estar condicionado al tamaño de la muestra, una de las principales limitaciones que conlleva el trabajo con animales.

Nuestros datos sugieren que ibuprofeno parece ser un fármaco bastante útil cuando se combina con antibióticos en el tratamiento de una OMA experimental. Una parte del beneficio que reporta se explica por el efecto analgésico de este fármaco que, al mitigar la otalgia, reduce el estado de anorexia en los animales y el deterioro físico que esta conlleva, apreciable sobre todo en la pérdida de peso. Por otro lado, con la combinación de los antibióticos con ibuprofeno se obtuvo una mejor eficacia bacteriológica, pero este es un fenómeno que no se puede achacar al efecto bactericida del ibuprofeno. La CMI de ibuprofeno para esta bacteria es de 1024 µg/mL y los estudios realizados en modelos experimentales empleando dosis similares de ibuprofeno se refieren a concentraciones séricas entre 6 y 14 µg/mL (Jungkeit MC and Chole RA 1991), de tal forma que para alcanzar la CMI en suero deberíamos administrar dosis muy elevadas del fármaco, probablemente tóxicas. Tampoco podemos explicar estos resultados por la acción sinérgica de los antibióticos con el ibuprofeno, si tenemos en cuenta los datos obtenidos de los estudios de sinergismo antimicrobiano *in vitro*. El aumento de eficacia bacteriológica podría ser debido al efecto inmunomodulador que presenta ibuprofeno ya que además de inhibir la COX- II, regula la respuesta citotóxica, la fagocitosis y la degranulación leucocítica (Cho JY 2007). Por último, hemos de ser prudentes a la hora de explicar la mejoría en los parámetros evaluados atendiendo a la capacidad de ibuprofeno para inhibir la formación de biopelículas. Aunque en los estudios *in vitro* hemos observado disminuciones significativas de la adherencia y de la biopelícula de *S. pneumoniae* FJD 60, *in vivo*, el tratamiento con ibuprofeno solo a cualquiera de las dosis no mostró mejoras significativas frente a los animales que no recibieron antibiótico.

Los datos obtenidos en nuestro estudio podrían resultar de interés si tenemos en cuenta que en humanos se alcanzan concentraciones séricas de ibuprofeno de aproximadamente 100 µg/mL cuando este fármaco se administra a dosis habituales (Cho JY 2007).

En cuanto al tratamiento antimicrobiano de la OMA, el protocolo de la terapia a seguir en casos de OMA es fuente de controversia, entre los expertos partidarios de una antibioterapia precoz (Gerber AU *et al* 1991, Hendley JO 2002) y aquellos que proponen un período de observación previo con tratamiento sintomático para observar la evolución de la enfermedad (Siegel RM *et al* 2005, Marchetti F *et al* 2005). Nuestros datos sugieren que, si existen suficientes indicios como para recomendar tratamiento antimicrobiano en casos de OMA, este debe ser instaurado lo más precozmente posible. El empleo de ibuprofeno combinado con antibióticos en el tratamiento de la OMA parece ofrecer mejoras con respecto al antibiótico solo, por lo que este fármaco puede ser especialmente útil a la hora de establecer una terapia adecuada para esta enfermedad. Además, ibuprofeno parece presentar cierta acción inhibitoria *in vitro* de las biopelículas bacterianas las cuales son de gran relevancia para que se establezca y mantenga la infección. En este aspecto, el conocimiento de los mecanismos de adherencia y formación de biopelículas, así como la búsqueda de sustancias que eviten la formación de estas biopelículas ofrecería un nuevo frente de actuación.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se estudió la capacidad de dos cepas de *S. pneumoniae* para adherirse y formar biopelículas sobre placas de poliestireno determinándose una cepa de gran capacidad (*S. pneumoniae* FJD 60) y otra, con menor capacidad (*S. pneumoniae* AR 09164)
2. Se realizó un estudio comparativo de la virulencia de ambas cepas en el modelo de OMA experimental observándose una mayor patogenicidad (valorada a través de 6 parámetros) con la cepa más adherente y mejor formadora de biopelícula (*S. pneumoniae* FJD 60). Por consiguiente, todos los estudios posteriores se realizaron con esta cepa.
3. Amoxicilina y eritromicina fueron más activas (reducción del número de ufc) frente a *S. pneumoniae* FJD 60 cuando los experimentos se realizaron en caldo nutritivo que cuando se empleó un medio carente de nutrientes y más cuando el inóculo se encontraba en fase de crecimiento exponencial.
4. Ibuprofeno presentó efecto antibacteriano frente a *S. pneumoniae* (CMI = 1024 µg/mL), pero no se halló efecto sinérgico con amoxicilina o eritromicina frente a la misma cepa.
5. Ibuprofeno fue capaz de disminuir la adherencia y formación de biopelículas de *S. pneumoniae* sobre placas de poliestireno. La asociación de ibuprofeno con concentraciones subinhibitorias de amoxicilina o eritromicina disminuyó la adherencia bacteriana con respecto al efecto observado con el antibiótico solo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.
6. La eficacia del tratamiento de la OMA experimental tanto con amoxicilina como con eritromicina se correlacionó con el momento de inicio del mismo, siendo más eficaz un tratamiento precoz (una sola dosis), que un tratamiento tardío (con 5 dosis).

7. El tratamiento de la misma OMA con amoxicilina combinada con ibuprofeno mejoró los resultados en comparación con los obtenidos con el antibiótico solo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.
8. El tratamiento de la misma OMA con eritromicina combinada con ibuprofeno mejoró los resultados en comparación con los obtenidos con el antibiótico solo, aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en la pérdida de peso respecto al régimen de tratamiento tardío.
9. La eficacia de ibuprofeno, en determinadas condiciones experimentales, podría deberse a su efecto inhibidor de la adherencia y de la formación de biopelículas, más que a un efecto inhibitorio sobre el microorganismo.
10. La mejor eficacia del tratamiento precoz frente al tardío en la OMA, tanto en ausencia como en presencia de ibuprofeno, podría deberse a una farmacodinamia más favorable en la fase precoz, al estado metabólico de los microorganismos en el oído medio (fase de crecimiento exponencial o fase de estado deprivada de nutrientes) o a una menor adherencia y formación de biopelículas en la fase temprana o precoz.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Advisory Committee of Immunization practices (ACIP). Preventing pneumococcal disease among infants and young children. MMWR 2000, 49: 1-35.
2. Ah-Tye C, Paradise JL, Colborn DK. Otorrhea in young children after tympanostomy tube replacement for persistent middle-ear effusion: prevalence, incidence, and duration. Pediatrics 2001, 107: 1251-8.
3. Aladag I, Guven M, Eyibilen A, Sahin S, Koseoglu D. Efficacy of vitamin A in experimentally induced acute otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2007, 71: 623-8
4. Allegrucci M, Hu FZ, Shen K, Hayes J, Erlich GD, Post JC and Sauer K. Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development. J Bacteriol 2006, 188: 2325-35.
5. Alem MA and Douglas J. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. Antimicrob Ag Chemother 2004, 1: 41-7.
6. AlonsoDe Velasco E, Verheul AF, Verhoef J and Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. Microbiol Rev 1995, December 4: 591-603.
7. American Academy of Pediatrics and American Academy of Family Physicians. Clinical practice guideline subcommittee on management of acute otitis media. "Diagnosis and management of acute otitis media". Pediatrics 2004, 113: 1451-65.
8. Aniansson G, Alm B, Andersson B *et al.* A prospective cohort study on breast-feeding and otitis media in Swedish infants. Pediatric Infect Dis J 1994, 13: 183-8.
9. Asociación Española de Pediatría. La enfermedad neumocócica y su prevención. Vacuna neumocócica conjugada hepatavalente. An Esp Pediatr 2002, 56: 79-90.
10. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. Mt. Sinai J. Med 1976, 43: 699-709
11. Azanza JR y Sádaba B. Perea EJ. Elección de un antibiótico. El tratamiento en niños, ancianos y embarazadas. dentro del Programa de Formación Continuada "Uso adecuado de antimicrobianos en atención primaria". Editorial Science Tools 2006, pag: 83-114.

12. Baquero F, Cantón R and Baquero-Artigao F. Current patterns and evolution of antibiotic resistance among bacterial pathogens involved in acute otitis media. Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3) : 26-33.
13. Baraibar R. "Incidence and risk factors of acute otitis media in children". Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3): 13-22.
14. Barnett ED, Klein JO, Pelton SI and Luginbht LM. Otitis media in children born to human immunodeficiency virus-infect mothers. Pediatr Infect Dis J 1992, 11: 360-4.
15. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Massignani V, Hultenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, von Euler A, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R and Henriques-Normark B. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. Microbiol. 2006, 103: 2857-62.
16. Barry B, Muffat-Joly M and Gehanno P. "Pharmacokinetics of antibiotics in the middle ear". Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3) : 37-41.
17. Bdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha AY. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm –producing *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2006, 27: 196-200.
18. Beobide I, Canut A, Gascón AR, Isla A, García-Rey C, de la Maza I, Labora A and Pedraz JL. "Evaluation of antimicrobial treatments in children with acute otitis media in Spain: a pharmacokinetic - pharmacodynamic (PK/PD) approach". J Chemother 2005, 17: 628-35.
19. Bergmann S and Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. Microbiol. 2006, 152: 295-303.
20. Berman S. "Classification and criteria of otitis media" " Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3): 1-4.
21. Berman S. "Acute otitis media unresponsive to treatment". Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3): 49-50.
22. Beutler B. Not "molecular Patterns" but molecules. Immunity 2003,19: 155-8.
23. Blazek-O'Neill B. "Complementary and alternative medicine in allergy, otitis media and asthma". Curr Allergy Asthma Rep 2005, 5: 313-8.

24. Bluestone CD. Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 42:207-23.
25. BOE del 8 Noviembre del 2007. Ley 32/2007 de 7 noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. N° 268, pag: 45914-20.
26. Boronat-Echeverría NE, Kageyama-Escobar AM, Méndez-Tovar L. Otitis externa micótica en pacientes con otitis media crónica. *An Orl Mex* 2005, 1: 45-55.
27. Brook I. Anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002, 111: 430-40.
28. Canvin JR, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW and Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae* produces a second haemolysin that is distinct from pneumolysin. *Microb. Pathog* 1997, 22: 129-32.
29. Casey JR and Pichichero ME. Changes in frequency and pathogens causing acute otitis media in 1995-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2004, 23: 824-28.
30. Castagno LA and Lavinsky L. Otitis media in children: seasonal changes and socioeconomic level. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002, 62: 129-34.
31. Cenjor C, Ponte C, Parra A, Nieto E, García-Calvo G, Giménez MJ, Aguilar L, Soriano F. In vivo efficacies of amoxicillin and cefuroxime against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in a gerbil model of acute otitis media. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42: 1361-34.
32. Cho JY. Immunomodulatory Effect of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) at the Clinical Available Doses. *Arch Pharm Res* 2007, 1: 64-74.
33. Chobillon AJ, De Alba MV, Soriano DB, Hernández GC, Alcántar EPV, Calleros HMP, Gómez JA. Otitis media aguda: actualidades en epidemiología, fisiopatología, cuadro clínico, complicaciones, diagnóstico, prevención y tratamiento. *Rev Hosp Gral Dr M Gea González* 2001, 1-2: 14-20.
34. Chole RA and Chiu M. Ultrastructure of middle ear mucosa in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Acta Otolaryngol* 1985, 100: 273-88.
35. Chonmaitre T, Howie VM, Truant AL. Presence of respiratory viruses in middle ear fluids and nasal wash specimens from children with acute otitis media. *Pediatrics* 1986, 77: 698-702.

36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.
37. Cohen R, Levy C, de la Rocque F, Gelbert N, Wollner A, Fritzell B, Bonnet E, Tetelboum R and Varon E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine and of reduction of antibiotic use on nasopharyngeal carriage of nonsusceptible pneumococci in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2006, 25: 1001-7.
38. Craig WA and Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1996, 15:255-9.
39. Cruz M. Fundamentos de terapéutica pediátrica. In: Cruz M. (ed.) 7^a ed. Tratado de pediatría. Espaxs, S.A., Barcelona 1994; p. 51-70.
40. Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkila I., and Tuomanen E.I. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet activating-factor. *Nature* 1995, 377: 435-8.
41. Dagan R, Hoberman A, Johnson C, Leibovitz EL, Arguedas A, Rose FV, Wynne BR, Jacobs MR. Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin/clavulanate in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2001, 20: 829-37.
42. Daniel HJ, Fulghum RS, Brinn JE and Barret KA. Comparative anatomy of Eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann Otol* 1982, 91: 82-9.
43. Del Castillo F. Otitis media aguda: criterios diagnósticos y aproximación terapéutica. *An Esp Pediatr* 2002, 56 Supl 1: 40-7.
44. Del Castillo F, Delgado Rubio A, Rodrigo G. de Liria C, Cervera J, Villafruela MA y Picazo JJ. "Consenso Nacional sobre otitis media aguda". *Anal Pediatr* 2007, 66: 603-10.
45. Diven WF, Evans RW, Alper C, Burckart GJ, Jaffe R and Doyle WJ. "Treatment of experimental acute otitis media with ibuprofen and ampicillin" *J.Pediatr. Otorhinolaryngol.* 1995, 33 : 127-39.
46. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, DIGEMID. Ministerio de Salud. República del Perú. Boletín 05-2008
47. Donlan RM and Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002, 2: 167-93.

48. Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmons P, El-Sayed I and El-Sayed MA. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 4980-88.
49. Dudkiewicz M, Livni G, Kornreich L, Nageris B, Ulanovski D, Ravhe E. Acute mastoiditis and osteomyelitis of the temporal bone. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005, 69: 1399-405.
50. Duncan B, Ey J, Holberg CJ *et al.* Exclusive breast feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Pediatrics* 1993, Mes 91: 867-72.
51. Eagle H. The effect of the size of the inoculum and the age of infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci and *Treponema pallidum*. *J Exp Med* 1949, 90: 595-607.
52. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, Daigle BJ, Ehrlich MD and Post JC. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002, 287: 1710-5.
53. Elvers KT and Wright SJ. Antibacterial activity of the anti-inflammatory compound ibuprofen. *Lett Appl Microbiol* 1995, 20: 82-4.
54. Esposito S, Lizioli A, Lastrico A, Begliatti E, Rognoni A, Tagliabue C, Cesati L, Carreri V and Principi N. Impact on respiratory tract infections of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine administered at 3, 5 and 11 months of age. *Respir. Res* 2007, 8:12.
55. European Community (1986). Journal oficial des comunatés européennes, 18 décembre. Report L358. Luxembourg: Office des publications officielles des communautés européennes.
56. Faden H and Dryja D. Recovery of a unique bacterial organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media. *J Clin Microbiol* 1989, 27: 2488-91.
57. Fenoll A, Jado I, Vicioso D and Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J. Clin Microbiol* 1997, 35: 764-766.
58. Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, Jiménez MJ, Tarragó D, Granizo JJ, Gimeno M, Coronel P. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditorem susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus Influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrobial Chemother* 2007, 60: 323-7.

59. François M. "New views on the pathogenesis of acute otitis media and its complication". Clin Microbiol Infect 1997, 3, (supp 3): 5-11.
60. Fulghum RS, Brinn JE, Smith AM, Daniel III HJ and Loesche PJ. "Experimental otitis media in gerbils and chinchillas with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and other aerobic and anaerobic bacteria". Infect Immun 1982, 36: 802-10.
61. Gala López González, Amalia Martínez Antón, Jesús Ruiz Contreras. Otitis media aguda. Guía_ABE_OMA 2006, V.1.
62. Garbut J, Rosenbloom I, Wu J, Storch GA. Empiric first-line antibiotic treatment of acute otitis in the era of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatrics 2006, 117: e1087-94.
63. García- Rodríguez JA and Martín IT. β -lactámico / Inhibidor de β -lactamasas. Medicine 1998, 7: 4116-27.
64. García-Suárez MM, Vázquez F and Méndez FJ. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006, 24: 512-7.
65. Gerber AU, Greter U, Segessenmann C and Kozak. The impact of the pre- treatment interval of antimicrobial efficacy in a biological model. J Antimicrob Chemother 1993, 31 (sup): D29-39.
66. Gene A, Garcia- Garcia JJ, Domingo A, Wienberg P and Palacin E. Etiology of acute otitis media in a children's hospital and antibiotic sensitivity of the bacteria involved. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004, 22: 377-80.
67. Giebink GS, Payne EE, Mills EL, Juhn SK and Quie PG. Experimental otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*: immunopathogenic response in the chinchilla. J Infect Dis 1976, 134: 595-604.
68. Gilbert RJ, Jiménez JL, Chen S, Tickle IJ, Rossjohn J, Parker M, Andrew PW and Saibil HR. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore forming-toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Cell 1999, 97: 647-55.
69. Gotsadze K and Gogatishvili R. Usage of medicines inducing secretolysis in treatment of acute otitis media in children. Georgian Med News 2005, 5: 21-5.
70. Grenier B. Decision-making in otitis media in children, Part I: epidemiologic data and definitions for a reliable cost-effectiveness analysis. Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3): S62-8.

71. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Erlich GD, Kerschner JE. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. JAMA 2006, 296(2):202-11
72. Hammaren-Malmi S, Saxen H, Tarkkanen J and Mattila PS. "Adenoidectomy does not significantly reduce the incidence of otitis media in conjunction with the insertion of tympanostomy tubes in children who are younger than 4 years : a randomized trial". Pediatrics 2005, 116: 185-9.
73. Hammerschmidt S, Tillig MP, Wolff S, Vaerman JP and Chatwal GS. Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. Mol. Microbiol 2000, 36: 726-36.
74. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E and Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. Infect. Imm 2005, 73: 4653-67.
75. Harnett W and Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? Immunol.Today 1999, 20: 125-9.
76. Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kaijalainen T, Poussa T, Leinonen M, Korpela R, Pitkaranta A. Treatment of acute otitis media with probiotics - prone children. A double blind, placebo-controlled randomised study. Clin Nutr 2007, 26: 314-21.
77. Hendley, J.O. "Otitis media". N Engl Med 2002, 347: 1169-73.
78. Hennekens CH and Borzak S. Cyclooxygenase-2 inhibitors and most traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs cause similar moderately increased risks of cardiovascular disease. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2008, 3: 41-50.
79. Hirano T, Kodama S, Fujita K, Maeda K and Suzuki M. Role of Toll-like receptor 4 in innate immune responses in a mouse model of acute otitis media. FEMS Immunol Med Microbiol 2007, 49: 75-83.
80. Homoe P, Christensen RB and Bretlau P. Acute otitis media and season of birth. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2005, 69: 487-91.
81. Honorato Pérez J, Campanero Martínez MA y Calahorra Vidarte B. Farmacocinética. Tablas compendio de concentraciones séricas y titulares. Capítulo 8 en J.E. García Sánchez, R. Lopez, J. Prieto. Antimicrobianos en Medicina. Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Cience 1999, pag: 109-20.

82. Houldsworth S., Andrew P.W., and Mitchell T.J. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 β by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun* 1994, 62: 1501-3.
83. Jacobs MR. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin Microbiol Infect* 2001, 7: 589-96.
84. Jarva H., Hellwage J., Jokiranta T.S., Lehtinen M.J., Zipfel P.F., and Meri S. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J. Immunol* 2004, 172: 3111-8.
85. J.Cervera Escario, F.Del Castillo Martín, J.A. Gómez Campderá, J.R. Gras Albert, B.Pérez Piñero, M. A. Villafuela Sanz. Indicaciones de Adenodectomía y Amigdalectomía: Documento de Consenso entre la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial y la Asociación Española de Pediatría. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2006, 57: 59-65.
86. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001 June 2: 187-207.
87. Jenkins SG, Farrell DJ, Patel M, Lavin BS. Trends in anti-bacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA, 200-2003: PROTEKT US years 1-3. *J Infect* 2005, 51: 355-63.
88. Jomaa M., Terry S., Hale C., Jones C., Dougan G., and Brown J. Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2006, 24: 5133-39.
89. Jungkeit MC and Chole RA. "Ibuprofen inhibits localized bone resorption in the middle ear". *Calcif Tissue Int* 1991, 48: 267-71.
90. Karma P, Sipila P, Virtanen T, Luotonen J, Sipila M and Haiva VM. Pneumococcal bacteriology after pneumococcal otitis media with special reference to pneumococcal antigens. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1985 10:181-90.
91. Kamerling JP. Pneumococcal polysaccharides: a chemical review. In: Tomasz A. ed. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Larchmont, NY, 2000; p.81-114.
92. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, and Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1995, 45: 406-8.

93. Kirkham LA, Kerr AR, Douce GR, Paterson GK, Dilts DA, Liu DF and Mitchell TJ. Construction and immunological characterization of a novel non-toxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. *Infect Immun* 2006, 74: 586-93.
94. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK and Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996, 22: 100-6.
95. Kirby AC, Raynes JG, and Kaye PM. The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis* 2005, 191: 1538-47.
96. Klein JO. Otitis media. *Clin Infect Dis* 1994, Mes 19: 823-33.
97. Klein JO. Otitis Externa, Otitis Media and Mastoiditis. Mandell G.L., Bennett J.E. y Dolin R. (Eds.) *Principles and Practise of Infections Diseases and their etiologic agents*. Philadelphia. Churchill, Livingstone. 2000, p. 669-75.
98. Klein JO. Management of otitis media : 2000 and beyond. *Pediatr Infect Dis J*, 2000 19 : 383-7.
99. Kleemola M, Nokso-Koivisto J, Herva E, Syrjänen R, Lahdenkari M, Kilpi T, Hovi T. Is there any specific association between respiratory viruses and bacteria in acute otitis media of young children? *J Infect*. 2006, 523:181-7
100. Knudsen JD, Frimodt-Moller N and Espersen F. Pharmacodynamics of penicillin are unaffected by bacterial growth phases of *Streptococcus pneumoniae* in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother* 1998, 41 : 451-9.
101. Kondon K and Hashiba M. Inhibitory effect of macrolide antibiotics on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1998, 101 : 25-36.
102. Krause PJ, Owens NJ, Nightingale CH, Klimek JJ, Lehmann WB and Quintiliani R. Penetration of amoxicillin , cefaclor, erithromycin-sulfisoxazole and trimethoprim-sulfamethoxazole into the middle ear fluid of patients with cronic serous otitis media. *J Infect Dis* 1982, 145 : 815-21.
103. Kristinsson KG, Magnusdottir AB, Petersen H and Hermansson A. "Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal" *Infect Dis* 2005, 191 : 1876-80

104. Krivan HC, Roberts DD and Gingsburg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6157-61.

105. Lawrence JR, Swerhone G, Wassenaar LI, Neu TR. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Can J Microbiol* 2005, 8: 665-9.

106. Lee A, Goyal R and Shan HY. Severe protracted fever following pneumococcal vaccine. *Am.J. Med.Sci* 2006, 332: 351-3

107. Leiberman A, Dagan R, Leibovitz E, Yagupsky P, Fliss DM. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999, 49 Suppl 1: S 151-3.

108. Lewis JD, Kimmel SE, Localio AR, Metz DC, Farrar JT, Nessel L, Brensinger C, McGibney K, and Strom BL. Risk of serious upper gastrointestinal toxicity with over-the-counter nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology* 2005; 129:1865-74.

109. Liao ZS, Chen C, Du H, Wu XL, Zhu JC and Li ZY. Change of Eustachian tube surfactant of guinea pigs suffering from secretory otitis media. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003, 38: 101.

110. Little P, Gould C, Williamson I, Moore M, Warner G and Dunleavey J. "Pragmatic randomised controlled trial of two prescribing strategies for childhood acute otitis media" *BMJ* 2001, 322 : 336-42.

111. López R and Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev* 2004, 28: 553-8.

112. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson, CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels M.R., and Golenbock D.T. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100: 1966-71.

113. Mandel EM and Casselbrant ML. Antibiotics for otitis media with effusion. *Minerva Pediatr* 2004, 56: 481-95.

114. Marco F, Liñares J y Miró JM. Utilidad de los estudios *in vitro* para seleccionar los estudios *in vivo*. JM Miró y JM Gatell. Modelos experimentales de patología infecciosa. Monografías Dr. Antonio Esteve. Fundación Dr. Antonio Esteve 2000. pag: 11-22.

115. Martínez- Marín C, Huelves L, del Prado G, García-Cía JI, Cenjor C, Ponte C, Granizo JJ and Soriano F. "Effect of erythromycin treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*." J Antimicrob. Chemother 2005, 56: 783-6.
116. Marchetti F, Ronfani L, Nibali SC, Tamburlini G, Italian Study Group on Acute Otitis Media. Delayed prescription may reduce the use of antibiotics for acute otitis media: a prospective observational study in primary care. Arch Pediatr Adolesc Med 2005, 159: 679-84.
117. Matsuoka A. Inflammatory middle ear diseases in children: sex differences. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 1994, Mes 97: 436-9.
118. Mc Ellistrem MC, Adams JM, Patel K, Mendelsohn AB, Kaplan SL, Bradley JS, Schultz GE and Kim KS. "Acute otitis media due to penicillin-non susceptible *Streptococcus pneumoniae* before and after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine" Clin Infect Dis 2005, 40 : 1738-44.
119. Melhus A and Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. APMIS 2003, 111: 989-94.
120. Mensa J, García-Vázquez E and Vila J. Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2003, 4: 200-7.
121. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. Nature Rev. Microbiol 2003, 1: 219-30.
122. Mold C, Rolic-Polic B and Du Clos TW. Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. J. Immunol 2002, 168: 6375-81.
123. Morfin BM. Otitis media. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas 1999, 1: 5-12.
124. Morejón M, Salud R and Cué M. Nuevos antimicrobianos. Rev Cubana Farm 2003, 37.
125. Moscoso M, García E and López R. Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. J Bacteriol 2006, 22: 7785-95.
126. Municio JA y Valencia JC. Manejo de la otitis en pediatría extrahospitalaria. Protocolos médicos 2003.

127. Muñoz R, Fenoll A, Vicioso D and Casal J. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis 1990, 13: 63-6.
128. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell G.L., Bennett J.E., and Dolin R. ed. Principles and Practice of Infections Diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000; p.2128-46.
129. Nandí-Lozano E, Espinosa LE, Viñas-Flores L and Ávila-Figueroa CA. Infección respiratoria aguda en niños que acuden a un centro de desarrollo infantil. Salud Pública de México 2002, 44: 201-6.
130. National Committee for Clinical Laboratory Standards. "Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial activity of antimicrobial agents". Approved guideline. Document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1999.
131. National Committee for Clinical Laboratory Standards. "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically" Approved Standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 2003.
132. Nau R and Eiffert H. Modulation of Release of Proinflammatory Bacterial Compounds by Antibacterials: Potential Impact on Course of Inflammation and Outcome in Sepsis and Meningitis. Clin Microbiol Rev 2002 January 1: 95-110.
133. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodríguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. J Appl Microbiol 2008, Epub ahead of print.
134. Nelson CT, Mason EO jr, Kaplan SL. Activity of oral antibiotics in middle ear and sinus infections caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: implications for treatment. Pediatr Infect Dis J 1994, 13: 585-9.
135. Niemela M, Pihakari O, Pokka T, Uhari M and Uhari M. Pacifier as a Risk Factor for Acute Otitis Media: A Randomized Controlled Trial of Parental Counseling. Pediatrics 2000, 3: 483-8.
136. Nomoto K. Prevention of Infections by Probiotics. Journal of Bioscience and Bioengineering 2005, 6: 583-92.
137. Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J and Paton JC. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 2007, 75: 350-7.

138. Ozkan H, Atlihan F, Genel F, Targan S, Gunvar T. IgA and/or IgG subclass deficiency in children with recurrent respiratory infections and its relationship with chronic pulmonary damage. *J Investig Allergol Clin Inmunol* 2005, 15: 69-74.
139. Pereira MB and Ramos BD. Acute and secretory otitis media. *J Pediatr (Rio J)* 1998, 74: S21-30.
140. Palmer J, Flint S and Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007, 34: 577-88.
141. Parra A, Ponte C, Cenjor J, García-Calvo G, Giménez MJ, Aguilar L, Soriano F. Optimal dose of amoxicillin in treatment of otitis media caused by a penicillin resistant pneumococcus strain in the gerbil mode. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46: 859-62.
142. Parra A, Ponte C, Cenjor J, García-Olmos M, Giménez MJ, Aguilar L and Soriano F. Is it possible to achieve bacterial eradication in otitis media with effusion by empirical antibiotic high doses and concomitant administration of acetaminophen? A microbiological and pharmacological study in the gerbil model. *Int J Antimicrobial Agents* 2003, 22: 508-15.
143. Parra A, Ponte C, Cenjor J, Martínez-Marín C, Soriano F and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Effect of antibiotic treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* strains with different susceptibilities to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 860-66.
144. Pérez-Trallero E, García de la Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, Dal-Ré R *et al.* Geographical and ecological analysis of the resistance, coresistance and coupled-resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 1965-72.
145. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008;72: 157-65.
146. Picazo JJ, Betriu C y González Romo F. Microbiología de las infecciones neumocócicas. Resistencia a antibióticos. *An Pediatr, Monogr* 2003, 1: 3-13.
147. Pichichero ME and Casey JR. Otitis media. *Expert Opin Pharmacother.* 2002, 3: 1073-90.
148. Pichichero ME and Casey JR. "Acute otitis media: making sense of recent guidelines on antimicrobial treatment". *J Fam Pract* 2005, 54: 313-22.

149. Piglansky L, Leibovitz E, Raiz S, Greenberg D, Press J, Leiberman A, Dagan R. Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin for therapy of acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003, 22: 405-13.
150. Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ and Keith JM. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J. Infect. Dis* 2001, 184: 582-90.
151. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martínez- DeOliveira J, Fonseca AF and Mardhs PA. "Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species". *J Med. Microbiol* 2000, 49: 831-40.
152. Ponte C, Parra , Cenjor C, García-Olmos M, Jiménez MJ, Aguilar L, Carcas A and Soriano F. "Does acetaminophen interfere in the antibiotic treatment of acute otitis media caused by a penicillin-resistant pneumococcus strain? A gerbil model". *Pediatr Res* 2003, 54: 913-8.
153. Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001, 12: 2083-94.
154. Prado V. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect* 2001, 18 (Supl.1): 6-9.
155. Prescott LA, Harley JP and Klein DA. Asociaciones simbióticas: parasitismo, patogenicidad y resistencia. Capítulo 29 en *Microbiología* (4ª edición), ed Mc Graw Hill Interamericana 2003, p. 599-624.
156. Principi N, Marchisio P, Schito GC, Mannelli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. *Pediatr Infect Dis J* 1999, 18: 517-23.
157. Prymula R. Present review of conjugated pneumococcus vaccines. *Klin. Mikrobiol. Infec.* 2006, 12: 98-102.
158. Ripley-Petzoldt ML, Giebink GS, Juhn SK, Aeppli D, Tomasz A and Tuomanen E. The contribution of the pneumococcal cell wall to the pathogenesis of experimental otitis media. *J Infect Dis* 1988, 157: 245-55.
159. Rodríguez-Martínez JM y Pascual A. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2008, 26: 107-14.
160. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis G and Rosendfeld RM. Otitis media. *Lancet* 2004, 363: 465-73.

161. Rubins J.B., and Janoff E.N. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. J. Lab. Clin. Med 1998, 131: 21-7.
162. Ruiz Díaz AI, Del Castillo F, Bilbao Garitagoitia A, Díaz Román C, García Miguel MJ, Borque C. Mastoiditis aguda: una entidad emergente. An Esp Pediatr 2002, 57: 427-31.
163. Ruoff KL, Whiley RA and Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray P.R., Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA and Tenover FC. ed. Clinical Microbiology. Washington D.C. ASM Press 2003; p. 405-21.
164. Salas R y Silva C. Reflectometría acústica: un método objetivo para el estudio de la efusión en el oído medio. Revista Médica de la Clínica Las Condes, Santiago, Chile, 2006. Volumen 17, 1.
165. Sato K, Quartey MK, Liebler C, Le T and Giebink GS. Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. Infect Immun 1996, 64: 1140-45
166. Scott EM, Tariq VN and McCrory RM. "Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate or propylparaben against *Candida albicans* in vitro". Antimicrob. Agents Chemother 1995, 39: 2610-4.
167. Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, Gobel UB, Weber JR, and Schumann RR. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. J. Biol. Chem 2003, 278: 15587-94
168. Serin GM, Ciprut A, Baylancicek S, Sari M, Akdas F and Tutkun A. Ototoxic Effect of Burow Solution Applied to the Guinea Pig Middle Ear. Otol Neurotol 2007, 28: 605-8.
169. Shah P and Swiatlo E. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun 2006, 74: 5888-92.
170. Shutt CK, Samore M and Carroll KC. Comparison of the Denka Seiken slide agglutination method to the quellung test for serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates. J. Clin. Microbiol 2004, 42: 1274-76.
171. Siegel RM, Kiely M, Bien JP, Joseph EC, Davis JB, Mendel SG, Pestian JP and DeWitt TG. "Treatment of otitis media with observation and a safety-net antibiotic prescription" Pediatrics 2003, 112 : 527-31

172. Soriano F. Microbiological etiologies of acute otitis media. Clin Microbiol Infect 1997, 3 (supp 3): 23-6.
173. Soriano F. Fundamentos farmacocinéticas y farmacodinámicos. dentro del Programa de Formación Continuada "Uso adecuado de antimicrobianos en atención primaria". Editorial Science Tools.2006, pag: 53-82.
174. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Myringotomy delays the tympanic membrane recovery in acute otitis media: a study in the rata model. Laryngoscope 2002, 112: 1474-81.
175. Stenstrom R, Bernard PA, Ben-Simhon H. Exposure to environmental tobacco smoke as a risk factor for recurrent acute otitis media in children under the age of five years. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1993, 27: 127-36.
176. Steven DL, Yan S and Bryant AE. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy *in vitro* and *in vivo*: an explantation for the inoculum effect. J Infect Dis 1992, 167: 1404-5.
177. Suzuki A, Watanabe O, Okamoto M, Endo H, Yano H, Suetake M, Nishimura H. Detection of human metapneumovirus from children with acute otitis media. Pediatr Infect Dis J 2005, 24: 655-7
178. Teele DW, Klein JO, Rosner BA *et al*. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in Greater Boston: a prospective cohort study. J Infect Dis 1989, Mes 160: 83-94.
179. Tomasz A. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. Proc. N. A. S. 1968, 59: 86-93.
180. Tomasz A, Albino A and Zanati E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature 1970, 227:138-40.
181. Tomasz A. Building and breaking on bonds in the cell wall of bacteria- The role for autolysin, p 3-12. *In* C Nombela (ed) Microbial cell wall and autolysins. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984.
182. Tonnaer EL, Rijkers GT, Meis JF, Klaassen CH, Bogaert D, Hermans PW, Curfs JH. Genetic relatedness between pneumococcal populations originating from the nasopharynx, adenoid, and tympanic cavity of children with otitis media. J Clin Microbiol 2005, 43: 3140-4

183. Tonnaer EL, Graamans K, Sanders EA, Curfs JH. Advances in Understanding the Pathogenesis of Pneumococcal Otitis Media. *Pediatr Infect Dis J* 2006, 6: 546-52.
184. Tramont EC and Hoover DL. Innate (general or non-specific) host defense mechanisms. In: In: Mandell GL, Bennett JE and Dolin R. ed. *Principles and Practice of Infections Diseases*. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000; p.31-38.
185. Tran Ba Huy P, Sauvaget E, Portier F. "Seromucous otitis" *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2007, 124: 120-5.
186. Ukkonen P, Varis K, Jernfors M, Herva E, Jokinen J, Ruokokoski E, Zopf D, Kilpi T. Treatment of acute otitis media with an antiadhesive oligosaccharide: a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet* 2000, 356: 1370-1.
187. Vila J, Soriano A y Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, 26: 48-55.
188. Weber PC and Koltai PJ. Chlamydia trachomatis in the etiology of acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991,100: 616-9.
189. Weiser JN Markiewicz Z, Tuomanen EL, Wani JH. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1996, 64: 2240-5.
190. Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ and Janoff E.N. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Microbiol* 2003, 100: 4215-20.
191. Widemar L, Hellström S, Stenfors LE. Different structural changes in membrane Shrapnelli in serous and purulent otitis media, an experimental study in the rat. *Acta Otolaryngol* 1986, 102: 266-73.
192. William RH, Sattuck MH, Zielinsky RJ, Kuo Ming-Shang T, Biermacher JJ, Smith DP, Jensen JL, Schaadt RD, Zurenko GE and Richards IM. Pharmacokinetics and Efficacy of Linezolid in a Gerbil Model of *Streptococcus pneumoniae*- Induced Acute Otitis Media. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47: 1355-63
193. Williamson I, Benge S, Mulle M, Little P. Consultations for middle ear disease, antibiotic prescribing and risk factors for reattendance: a case-linked cohort study. *Br J Gen Pract* 2006, 6: 170-5.

194. Wright CG and Meyerhoff WL. Pathology of otitis media. *Ann Oto Rhinol Laryngol* 1994, 103 (suppl 163): S24-6.
195. Wright PF, Thompson J, Toffelson S, Reed G. Acute otitis media: the contributions of viruses, bacteria, genetics and environment. *Semin Pediatr Dis* 1995, 6: 85-9.
196. Yariktas M, Doner F, Dogru H, Yasan H and Delibas N. The role of free oxygen radicals on the development of otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004, 68: 889-94.
197. Zhanel GG, Wang X, Nichol K, Nikulin A, Wierzbowski AK, Mulvey M, Hoban DJ. Molecular characterisation of Canadian paediatric multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* from 1998-2004. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 28: 465-71.

BIBLIOGRAFÍA EN INTERNET

<http://www.animalls.net/ARTIC21.HTML>

http://cancer.isciii.es/vacunab/Neumococo_18-6-01.PDF

www.chori.org/.../test_research.

<http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/inflamacion/antiinflamatorios-no-esteroides-via-sistematica/ibuprofeno>

http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/sistema_nervioso/analgesicos/analgesicos-no-opiaceos/paracetamol-acetaminofeno/

www.fisterra.com/guias2/omc.asp.

www.hipernatural.com/es/enfneumococo

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/i002.htm>

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074>

www.nature.com/.../n8/fig_tab/embor106_f2.html

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster/a682159-es.html>

<http://otitismedias.hawkelibrary.com/>.

<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/163/1/Otitis-Media-Secretora>

www.tu-audicion.com/.../images

VIII. APÉNDICE

Effect of erythromycin treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*

Carmina Martínez-Marín¹, Lorena Huelves¹, Gema del Prado¹, José I. García-Cía¹,
Carlos Cenjor², Carmen Ponte¹, Juan J. Granizo³ and Francisco Soriano^{1*}

¹Unit for Research in Medical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, ²Otolaryngology, and

³Epidemiology, Fundación Jiménez Díaz—UTE, Avenida de Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Received 8 April 2005; returned 21 June 2005; revised 28 June 2005; accepted 15 August 2005

Objective: To evaluate the effect of delayed administration of erythromycin in the course of acute otitis media caused by an erythromycin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* strain in the gerbil model.

Methods: The bacterium was inoculated by transbullar challenge in the middle ear (ME) and antibiotic treatment at different doses was administered at various times thereafter.

Results: When 2.5 mg/kg of erythromycin was administered as a single dose 2, 5, 18 or 21 h post-inoculation (pi) the bacterial eradication rate was 55, 40, 0 and 0%, respectively. A higher dose (5 mg/kg) administered also as a single dose 2, 5, 18 and 21 h pi achieved bacterial eradication rates of 62.5, 43.8, 0 and 0%, respectively. Using a very high dose (50 mg/kg) repeated three times at 3 h intervals (total dose 150 mg/kg) and starting the treatment 21 h pi only achieved bacterial eradication in 25% of cases. The concentration of erythromycin achieved in the ME 90 min after administration of 5 mg/kg 5 or 21 h pi was very similar (0.74 and 0.79 mg/L) but the ME half-life was longer (98.2 min) with the early administration as compared with the delayed form (47.5 min), which could partially explain the different results. Further experiments showed that the failures observed with the delayed administration were not related to the time elapsed from antibiotic administration to ME sampling or selection of antibiotic-resistant mutants.

Conclusion: Bacteriological and clinical efficacies were significantly diminished if antibiotic administration was delayed.

Keywords: otitis, pneumococcal, therapy delay, gerbils

Introduction

Acute otitis media (AOM) is one of the most frequent illnesses of childhood, the predominant bacterium involved being *Streptococcus pneumoniae*.¹ As many cases of AOM will resolve spontaneously, it has been suggested that treatment with antimicrobials should be delayed awaiting a possible clinical improvement.^{2,3} However, the effect of delayed antibiotic treatment has not been studied. We have previously shown that the efficacy of amoxicillin in the treatment of experimental AOM caused by *S. pneumoniae* decreased with delayed antibiotic treatment.⁴

The aim of this study was to evaluate the effect of delayed administration of erythromycin in the course of an experimental AOM caused by an erythromycin-susceptible *S. pneumoniae* strain.

Materials and methods

Bacteria

A strain of *S. pneumoniae* (serotype 23F) (erythromycin MIC 0.12 mg/L) was used.

Antibiotic

Erythromycin (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) and erythromycin lactobionate (Pantomicina; Abbott Laboratories, S.A., Madrid, Spain) were used for *in vitro* and *in vivo* studies.

In vitro studies

Erythromycin MICs were determined in 32 isolates collected from treated animals without complete bacterial eradication and in four from controls.

*Corresponding author. Tel: +34-91-544-73-87; Fax: +34-91-549-47-64; E-mail: fsoriano@fjd.es

Animals

Mongolian gerbils were purchased from the Centre d'Élevage R. Janvier (Le Genest, St-Isle, France) and managed as previously described.⁵ The study was performed following current regulations regarding the use of laboratory animals in the European Community and was approved by our Ethics Committee.

Experimental otitis

Animals were inoculated bilaterally into the middle ear (ME) bulla with $\sim 10^6$ cfu of *S. pneumoniae* in 20 μ L following published methods.^{4,5}

Treatment regimens and efficacy studies

Erythromycin was given subcutaneously as a single dose (2.5 and 5 mg/kg) administered at 2, 5, 18 and 21 h post-inoculation (pi). Experiments using three infusions of 5 and 50 mg/kg (total dose of 15 and 150 mg/kg, respectively) at different times (2, 5 and 8, or 21, 24 and 27 h pi) were also carried out.

Animals in the control groups received pyrogen-free sterile distilled water. Groups of 8–10 animals per treatment and control groups were included. Efficacy was evaluated at 48 h pi for single and repeated doses. Other groups of animals were evaluated at 29 h pi after repeated doses administered at 2, 5 and 8 h pi.

Treated and control animals were evaluated for otorrhoea, weight and otoscopic appearance. Otoloscopic features were evaluated as previously defined⁴ and ME washings were obtained from both ears at 29 and 48 h pi and plated for colony counting.

Pharmacokinetic studies

Serum levels of erythromycin were determined in healthy animals after a single subcutaneous injection of 5 mg/kg of the antibiotic. Groups of six animals per dose had blood samples obtained at 15, 30, 60 and 120 min after drug administration. Antibiotic concentrations in ME fluid (MEF) without washing were determined in groups of 10 animals bilaterally inoculated with the organism. A single 5 mg/kg dose of

erythromycin was subcutaneously administered 5 or 21 h pi and MEF samples were obtained 60, 90 and 120 min thereafter. Aliquots of MEF samples were pooled for determination of antibiotic levels.

Antibiotic concentrations were determined by microbiological assay. Assay variability for individual samples was <10%.

Statistical analysis

For qualitative variables the Fisher's exact test was used. The Mann–Whitney test was used to compare the reduction of \log_{10} cfu and loss of body weight. To compare the otoscopic appearance the χ^2 test for trends was used.

Results

In vitro studies

The erythromycin MIC values for all isolates from control and treated animals remained at 0.12 mg/L.

Experimental otitis and therapeutic efficacy

After inoculation of $6.22 \pm 0.36 \log_{10}$ cfu (mean \pm SD of all experiments) bilateral AOM and otorrhoea was observed in all untreated animals that showed lethargy and significant weight loss. Table 1 presents the bacteriological and clinical efficacy of erythromycin administered as a single dose at different intervals. A significant reduction in otorrhoea only occurred in those animals treated with any dose 2 h after bacterial challenge as compared with untreated controls. A significant reduction in the AOM was observed only in those animals treated with 5 mg/kg of erythromycin administered 2 h pi as compared with any other groups. Animals treated with any dose between 2 and 5 h pi showed significant reduction in the number of culture-positive ears as compared with any other group within the same dose and untreated control. A significant reduction in the number of organisms recovered from the ME, as compared with untreated controls, was observed after administration of 2.5 mg/kg 2 h pi, and

Table 1. Bacteriological and clinical efficacies^a of erythromycin administered in two doses in a single shot at different intervals after bacterial inoculation

Dose (mg/kg)	Challenge to treatment (h)	Otorrhoea (%)	Percentage of			Culture-positive ME samples (%)	Mean bacterial count (\log_{10} no. of cfu per 20 μ L) \pm SD	Mean body weight loss (%) \pm SD
			AOM	IOM	OME			
Untreated control	NA ^b	100	100	0	0	100	3.18 ± 0.57	13.98 ± 3.07
2.5	2	70 ^c	75	15	10	45 ^d	0.97 ± 0.67^c	5.99 ± 2.14^c
	5	90	90	10	0	60 ^d	2.55 ± 1.76	7.15 ± 2.63^c
	18	95	95	5	0	100	3.25 ± 0.66	11.69 ± 1.43
	21	90	90	10	0	100	3.04 ± 0.72	13.01 ± 1.97
5	2	53.3 ^c	18.8 ^d	25	56.2	37.5 ^d	0.97 ± 0.59^c	5.48 ± 3.56^c
	5	87.5	75	6.2	18.8	56.2 ^d	1.52 ± 0.98^c	9.81 ± 2.74^c
	18	100	93.8	6.2	0	100	2.78 ± 0.79	14.09 ± 4.52
	21	100	93.8	6.2	0	100	3.04 ± 0.67	12.88 ± 3.98

AOM, acute otitis media; IOM, intermediate otitis media; OME, otitis media with effusion.

^aEvaluated 48 h post-bacterial inoculation.

^bNA, not applicable.

^cSignificant difference ($P < 0.05$) from value for untreated control.

^dSignificant difference ($P < 0.01$) from values for any other group within the same dose and untreated control.

Delayed erythromycin treatment in pneumococcal otitis media

Table 2. Bacteriological and clinical efficacies^a of erythromycin administered in doses of 5 and 50 mg/kg in three shots (total dose of 15 and 150 mg/kg, respectively) at early (2, 5 and 8 h) or delayed (21, 24 and 27 h) starting times after bacterial inoculation

Dose (mg/kg)	Challenge to treatment (h)	Otorrhoea (%)	Percentage of			Culture-positive ME samples (%)	Mean bacterial count (log ₁₀ no. of cfu per 20 µL) ± SD	Mean body weight loss (% ± SD)
			AOM	IOM	OME			
Untreated control	NA ^b	100	100	0	0	100	3.44 ± 0.44	12.01 ± 3.43
5	2	25 ^c	0 ^c	12.5	87.5	0 ^c	<0.6 ^c	3.69 ± 0.89 ^c
	21	100	87.5	12.5	0	93.8	2.67 ± 0.79	13.84 ± 2.93
50	21	100	87.5	12.5	0	75.0	1.84 ± 0.84 ^c	12.99 ± 2.20

AOM, acute otitis media; IOM, intermediate otitis media; OME, otitis media with effusion.

^aEvaluated 48 h post-bacterial inoculation.

^bNA, not applicable.

^cSignificant difference ($P < 0.01$) from values for any other group.

5 mg/kg administered 2 and 5 h pi. The reduction in body weight was significantly lower as compared with untreated controls in those animals receiving any dose of erythromycin but only when administered 2 and 5 h pi. Increasing the erythromycin dose from 2.5 to 5 mg/kg only significantly improved the otoscopic appearance when the antibiotic was administered 2 h pi.

Table 2 presents the bacteriological and clinical results after administering three shots of 5 and 50 mg/kg (total dose of 15 and 150 mg/kg, respectively) starting 2 and 21 h pi for the first dose and 21 h pi for the latter. The most effective regimen for all evaluated parameters was the administration of 5 mg/kg of erythromycin 2 h pi, the delayed treatment being less efficacious even after using a very high dose. The only parameter that improved with the highest dose, as compared with the 5 mg/kg both administered 21 h pi, was the reduction in bacterial colony counts.

When the results obtained after the administration of 5 mg/kg of erythromycin as a single dose are compared with those obtained with the dose of 5 mg/kg in three doses (Tables 1 and 2) the antibiotic efficacy increased only when administered 2 h pi ($P < 0.05$).

Because the antibiotic efficacy was determined 48 h pi, while the treatment was started 2 and 21 h pi, the results could have been influenced by the difference in the time elapsed from antibiotic administration to ME sampling. To rule out this possibility a group of animals received 5 mg/kg in three doses starting the treatment 2 h pi and making the bacteriological evaluation 27 h after treatment initiation (29 h pi). At this latter period of evaluation the antibiotic had already achieved complete bacterial eradication while all untreated animals were ME culture-positive with a mean (±SD) bacterial count of $4.29 \pm 0.75 \log_{10}$ cfu in 20 µL.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic data

The serum concentration of erythromycin 15 min after administration of 5 mg/kg was 1.64 ± 0.21 mg/L with a half-life of 31 min and an AUC of 98.6 mg·min/L. This dose administered 5 or 21 h pi produced, 90 min thereafter, a MEF concentration of 0.74 or 0.79 mg/L. The half-lives and AUC/MIC ratios were 98.2 or 47.5 min, and 1236 or 732, which correlated with bacterial eradication of 43.8% and 0%, respectively.

Discussion

Most experiments were carried out using 2.5 or 5 mg/kg of erythromycin because such doses achieve serum and ME concentrations

in gerbils similar to those obtained in children receiving the standard dose for the treatment of AOM.⁶⁻⁹ The best therapeutic regimen after once-only administration of the antibiotic was related to both time from challenge to treatment and erythromycin dose. When the antibiotic was administered 18 or 21 h pi neither a dose of 2.5 nor 5 mg/kg improved bacteriological and clinical results as compared with untreated controls.

The poorer efficacy observed with delayed administration of the antibiotic was not due to selection of subpopulations with higher MIC values. Furthermore, such results cannot be explained by the bacterial burden present at time of treatment initiation because the antibiotic efficacy was greater at 5 h than at 21 h, the bacterial burden being lower at later times in untreated controls.⁴ The delayed administration of three doses of either 5 or 50 mg/kg improves efficacy only slightly. The most significant pharmacokinetic/pharmacodynamic differences were the lower half-life and AUC values obtained when the antibiotic was delayed compared with early administration. Such differences could be due to the presence of otorrhoea at the time of delayed administration.

The better pharmacodynamic properties when 5 mg/kg of the antibiotic was administered early as a single dose compared with delayed administration could be responsible, in part, for the higher efficacy (bacterial eradication of 43.8 versus 0%). However when a higher dose was administered (5 mg/kg in three doses; total 15 mg/kg) in delayed form the eradication rate was not significantly improved (6.2%). Even administration of a very high dose (150 mg/kg) in three doses in delayed form increased the efficacy only modestly (25% eradication).

The clinical relevance of our results is unclear. The use of antibiotics in AOM is controversial but our results suggest that even if they are given in some cases, they should be administered as early as possible, as proposed by Hendley.¹⁰

Acknowledgements

This study was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI030208) Ministerio de Sanidad y Consumo, and presented in part at the 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Copenhagen, Denmark, 2-5 April 2005. CM-M and LH were aided by scholarships from the Fundación Conchita Rábago, and GdP by a scholarship from the FIS, Madrid, Spain.

References

1. Bluestone CD, Stephenson JS, Martín, L.M. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1992; **11** Suppl 8: 7–11.
2. Little P, Gould C, Williamson I *et al.* Pragmatic randomised controlled trial of two prescribing strategies for childhood acute otitis media. *Br Med J* 2001; **322**: 336–42.
3. Froom J, Culpepper L, Jacobs M *et al.* Antimicrobials for acute otitis media? A review from the International Primary Care Network. *Br Med J* 1997; **315**: 98–102.
4. Parra A, Ponte C, Cenjor C *et al.* Effect of antibiotic treatment delay on the therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* strains with different susceptibilities to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 860–6.
5. Soriano F, Parra A, Cenjor C *et al.* Role of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in the development of acute otitis media with effusion in a gerbil model. *J Infect Dis* 2000; **181**: 646–52.
6. Craig WA, Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1996; **15**: 255–9.
7. Nelson CT, Mason EO JR, Kaplan SL. Activity of oral antibiotics in middle ear and sinus infections caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: implications for treatment. *Pediatr Infect Dis J* 1994; **13**: 585–9.
8. Ginsburg CM, McCracken GH Jr, Nelson JD. Pharmacology of oral antibiotics used for treatment of otitis media and tonsillopharyngitis in infants and children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1981; **90** Suppl: 37–43.
9. Ponte C, Parra A, Cenjor C *et al.* Does acetaminophen interfere in the antibiotic treatment of acute otitis media caused by a penicillin-resistant pneumococcus strain? A gerbil model. *Pediatr Res* 2003; **54**: 913–18.
10. Hendley JO. Otitis media. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1169–74.

Impact of Ibuprofen Therapy in the Outcome of Experimental Pneumococcal Acute Otitis Media Treated With Amoxicillin or Erythromycin

GEMA DEL PRADO, CARMINA MARTÍNEZ-MARÍN, LORENA HUELVES, MATILDE GRACIA, VIOLETA RODRÍGUEZ-CERRATO, RICARDO FERNÁNDEZ-ROBLAS, CARMEN PONTE, CARLOS CENJOR, AND FRANCISCO SORIANO

Unit for Research in Medical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy [G.P., C.M.-M., L.H., M.G., V.R.-C., R.F.-R., C.P., F.S.] and Service of Otolaryngology [C.C.], Fundación Jiménez Díaz-Capio, 28040 Madrid, Spain

ABSTRACT: The impact of ibuprofen combined with amoxicillin or erythromycin for therapy of penicillin-resistant pneumococcal acute otitis media (AOM) was evaluated in a gerbil model. Ibuprofen (at 15 or 7.5 mg/kg, orally) and/or amoxicillin or erythromycin (5 mg/kg each, s.c.) were administered at 5 h (early therapy, as single-dose regimen) or at 18 h (delayed therapy, five doses) postinoculation (PI). Each antibiotic alone and combined with ibuprofen was more effective administered as early regimen than as delayed treatment when evaluating the presence of otorrhea, otoscopic aspect, culture-positive and bacterial counts in middle ear (ME) samples, and loss of body weight. There was a trend for a better bacteriological outcome in animals receiving amoxicillin or erythromycin and ibuprofen, specially with the high dose. Such a dose of ibuprofen, associated with each antibiotic regimen, also preserved the animal well-being, avoiding a great weight loss in comparison to those receiving the antibiotic alone but a statistically significant difference was only observed for animals receiving delayed therapy with erythromycin and high-dose ibuprofen. In conclusion, ibuprofen combined with antibiotics seemed to improve the outcome of this experimental pneumococcal AOM. (*Pediatr Res* 60: 555–559, 2006)

AOM is one of the most frequently diagnosed infectious diseases and the most common reason for antibiotic prescriptions written for children in many countries (1). Most experts recommend empirical antimicrobial treatment of AOM in children to eradicate the pathogen and the use of an anti-inflammatory or analgesic drug such as ibuprofen or acetaminophen to relieve the symptoms (2,3). Acetaminophen acts as a weak inhibitor of the synthesis of prostaglandins inhibiting cyclooxygenase (COX)-2-dependent pathways (4). In contrast, ibuprofen inhibits both COX-1 and COX-2 having more potent analgesic and anti-inflammatory effects (5). We previously demonstrated using an experimental AOM model caused by *Streptococcus pneumoniae* that acetaminophen combined with amoxicillin/clavulanic acid or erythromycin

had neither a synergistic nor an antagonistic effect on the antipneumococcal activity (6). Therefore, use of acetaminophen to alleviate ear pain and decrease body temperature (3) may be advocated alone or combined with an antibiotic in the management of AOM. We selected ibuprofen, a potent anti-inflammatory drug, to determine its effect when combined with antimicrobial treatment on the outcome of penicillin-resistant pneumococcal AOM in a gerbil model.

METHODS

Bacteria. A strain of *S. pneumoniae* serotype 23 F [minimum inhibitory concentration (MIC) for benzylpenicillin = 2 µg/mL] isolated from a bacteremic patient was used.

Pharmacological compounds. Ibuprofen sodium salt and erythromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and amoxicillin trihydrate (Glaxo-SmithKline, Worthing, UK) were used for *in vitro* studies. For *in vivo* (therapeutic) use, Junifen, an ibuprofen suspension (Boots Healthcare International, Nottingham, UK), was used diluted with sterile distilled water to the desired concentrations. Commercial vials [Clamoxyl (amoxicillin), Glaxo-SmithKline, S.A., Madrid, Spain, and Pantomicina (erythromycin lactobionate), Abbott Laboratories, S.A., Madrid, Spain] were reconstituted in nonpyrogenic sterile distilled water to the desired concentrations.

***In vitro* studies.** MIC and minimum bactericidal concentration values were determined for amoxicillin, erythromycin, and ibuprofen by a microdilution broth method following the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards) procedures (7,8). Checkerboard broth microdilution method for antibiotic and ibuprofen synergy testing was used following recommended methods (9). A fractional inhibitory concentration index value of ≤0.5 was defined as synergism, >0.5–4 as indifference, and >4 as antagonism. All *in vitro* experiments were done in triplicate.

Animals. Eight- to 9-wk-old adult female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) that weighed 49 ± 5 g each were purchased from the Centre d'Élevage R. Janvier (Le Genest, St.-Isle, France). They were given free access to food and water and were housed in a protected unit with a slight negative pressure and with 12-h light/dark cycles. For invasive procedures, animals were intramuscularly anesthetized with 50 mg/kg ketamine (Ketolar; Parke-Davis, Barcelona, Spain) and 13 mg/kg xylazine (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany).

The study was performed in accordance with prevailing regulations regarding the care and use of laboratory animals in the European Community

Received March 6, 2006; accepted June 17, 2006.

Correspondence: Francisco Soriano, M.D., Ph.D., Unit for Research in Medical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, Fundación Jiménez Díaz-Capio, Avenida de Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain; e-mail: fsoriano@fjd.es.

This work was supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI030208, Spain. G.d.P., C.M.-M., and L.H. received scholarships from the Fundación Conchita Rábago, Madrid, Spain, and M.G. was aided by a scholarship from the FIS.

DOI: 10.1203/01.PDR.0000242258.52590.b5

Abbreviations: AOM, acute otitis media; BHIE, brain-heart infusion broth enriched with 5% horse serum; CFU, colony-forming unit; ME, middle ear; MEWF, middle ear washing fluid; MIC, minimum inhibitory concentration; PI, postinoculation

and approved by the Review Board for Animal Experimentation of Fundación Jiménez Díaz-Capio.

Experimental otitis. An overnight culture of the organism was kept in aliquots at -70°C , and on each day of experimentation, a freshly thawed aliquot of *S. pneumoniae* was incubated for 4 h at 35°C in brain-heart infusion broth (Oxoid, Ltd., Basingstoke, UK) enriched with 5% horse serum (BHIE) (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, France). Animals were inoculated bilaterally, as previously reported (10), with $\sim 10^6$ colony-forming units (CFU) of *S. pneumoniae* per 20 μL , which were introduced directly in the ME bulla. The number of viable bacteria in the different inocula was determined by colony counting. The tympanic membrane was left intact and swelled without rupture during the inoculation. The normal tympanic aspect and correct inoculation were verified by an otolaryngologist by direct otomicroscopy using an operating microscope. AOM was defined as otorrhea through a perforation in the tympanic membrane and/or inflammatory signs with changes in the membrane's normal yellowish-pink appearance to a gray, dark brownish-yellow, or whitish opaque area, with a very rough surface texture. Three animals (six ears) were inoculated with 20 μL of BHIE per ear to find out the possible role of broth as inductor of otitis media.

To explore the presence of bacteremia in infected animals, blood cultures were performed in four animals 20 h after bacterial inoculation.

Treatment regimen and efficacy studies. Each antibiotic was tested at 5 mg/kg and was administered s.c. in 500 μL . Ibuprofen was administered orally at 2.5 or 7.5 mg/kg 30 min before each antibiotic dose in experiments carried out in parallel. Different times of treatment initiation (at 5 and 18 h PI) and number of doses (one or five at 3-h intervals) were evaluated. The first regimen (early therapy) comprised 60 animals per antibiotic distributed in six equal groups (untreated controls, ibuprofen 2.5 mg/kg, ibuprofen 7.5 mg/kg, antibiotic (amoxicillin or erythromycin), ibuprofen 2.5 mg/kg plus antibiotic, and ibuprofen 7.5 mg/kg plus antibiotic) treated in one single dose 5 h PI. The second regimen (delayed therapy) comprised six identical groups but treated in five doses (at 3-h intervals) starting 18 h PI. All therapeutic groups received the same volume administered orally and s.c. per animal with the drug dilution or alternatively with apyrogenated sterile distilled water.

Treated and control animals were studied longitudinally for the presence of otorrhea (24 h PI), change in weight and otoscopic aspect, and composition of ME fluid (48 h PI). The ME samples were obtained from both ears by washing the ME fossa with 20 μL of saline injected and withdrawn via the epitympanic membrane with a 0.33-mm needle to determine bacterial counts in ME washing fluid (MEWF). Shortly after sampling, aliquots of serial 10-fold dilutions in saline were plated onto sheep blood agar and incubated for 24 h at 35°C in a 5% CO_2 atmosphere. Bacterial counts are expressed as \log_{10} CFU/20 μL ; the lowest detectable bacterial count was 4 CFU/20 μL (0.60 \log_{10} CFU/20 μL). For evaluating the presence of polymorphonuclear leukocytes, 3 μL of MEWF was extended over a 6-cm² slide surface to be Gram stained and observed under a high-power ($\times 1000$) microscope. The number of cells in 20 fields was calculated and expressed as mean [standard deviation (SD)] per field.

Statistical analysis. To compare the otoscopic appearance, the χ^2 test for trends was used. For other qualitative variables, the Fisher exact test was used. Continuous variables were expressed as means (SD). The Kruskal-Wallis test was used to compare the loss of body weight, the reduction of \log_{10} CFU/20 μL , and polymorphonuclear leukocyte counts in ME fluid among groups. Data for culture-negative samples were included in the calculation of means by assuming a value at the detection limit (0.60 \log_{10} CFU). A p value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

In vitro studies. The MIC/minimum bactericidal concentration values were 1/1, 0.12/0.12, and 1024/2048 $\mu\text{g/mL}$ for amoxicillin, erythromycin, and ibuprofen, respectively. The combination of ibuprofen with either amoxicillin or erythromycin was neither synergistic nor antagonist but indifferent (fractional inhibitory concentration index = 0.56–1.03).

Experimental otitis and therapeutic efficacy. Animals inoculated with BHIE showed no clinical or abnormal otoscopic signs, and at day 2 PI the MEWF cultures were negative. The blood cultures were positive in three of the four animals inoculated with the organism to explore the presence of bacteremia.

Table 1 presents the comparative findings of untreated control animals and the early treated animals with low- and high-dose ibuprofen alone and combined with amoxicillin. Early treatment with amoxicillin with and without ibuprofen significantly improved all the parameters related with outcome as compared to those observed in untreated controls and those receiving ibuprofen alone. Moreover, ibuprofen (especially in the high-dose group) associated with amoxicillin showed improved results compared to those of the antibiotic alone, although the difference was not statistically significant. All antibiotic-treated animals had significantly lower amounts of polymorphonuclear leukocytes per field in their MEWF (range, 0.81 ± 0.48 – 1.64 ± 1.06) compared to those animals not treated with antibiotic (range, 4.06 ± 5.1 – 6.19 ± 0.35).

Table 2 presents the comparative therapeutic findings of untreated controls and animals receiving delayed therapy with amoxicillin and/or combined with ibuprofen at low and high doses, administered as five doses 18 h PI. In 70–100% of animals receiving delayed therapy, otorrhea and AOM were observed. All animals receiving amoxicillin with or without ibuprofen showed significantly lower bacterial counts in the ME compared to untreated controls. In fact, animals receiving amoxicillin combined with ibuprofen showed a more pronounced reduction in bacterial counts even than those receiving the antibiotic alone. Animals receiving amoxicillin and the high dose of ibuprofen showed the lowest weight loss compared to any other group. All antibiotic-treated animals had lower amounts of polymorphonuclear leukocytes per field in

Table 1. Outcome of AOM caused by *S. pneumoniae* early (5 h PI) treated with one single dose of ibuprofen (IBU) and amoxicillin (AMX)

Group	Otorrhea (%)	No. of ears with AOM (%)	No. of ME culture-positive samples (%)	Bacterial counts \log_{10} CFU/20 μL , mean \pm SD	% Body weight loss, mean \pm SD
Untreated controls	100	100	100	2.66 ± 0.65	12.94 ± 3.16
IBU 2.5 mg/kg	100	90	95	2.69 ± 0.72	10.76 ± 5.38
IBU 7.5 mg/kg	85	90	95	2.90 ± 0.86	12.35 ± 3.19
AMX 5 mg/kg	65*	55†	40†	$1.21 \pm 0.84†$	$3.41 \pm 3.47†$
AMX 5 mg/kg + IBU 2.5 mg/kg	50†	50†	35†	$1.11 \pm 1.00†$	$1.69 \pm 2.67†$
AMX 5 mg/kg + IBU 7.5 mg/kg	35†	55†	20†	$0.85 \pm 0.61†$	$0.92 \pm 3.35†$

* Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of untreated controls and low dose of ibuprofen alone.

† Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of non-amoxicillin-treated animals

Table 2. Outcome of AOM caused by *S. pneumoniae* treated in delayed form (18 h PI) with five doses of ibuprofen (IBU) and amoxicillin (AMX)

Group	No. of ME culture-positive samples	Bacterial counts log ₁₀ CFU/20 µL, mean ± SD	% Body weight loss, mean ± SD
Untreated controls	100	3.19 ± 0.73	11.40 ± 2.02
IBU 2.5 mg/kg	85	2.62 ± 1.11	9.35 ± 3.79
IBU 7.5 mg/kg	95	2.59 ± 0.97	13.18 ± 2.50
AMX 5 mg/kg	95	2.25 ± 0.78*	8.68 ± 2.04†
AMX 5 mg/kg + IBU 2.5 mg/kg	85	1.82 ± 0.92‡	9.57 ± 3.76
AMX 5 mg/kg + IBU 7.5 mg/kg	80	1.79 ± 0.93‡	6.79 ± 2.46†

* Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of untreated controls.† Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of untreated controls and high dose of ibuprofen.‡ Significant difference ($p \leq 0.05$) from all other non-amoxicillin-treated groups.**Table 3.** Outcome of AOM caused by *S. pneumoniae* early (5 h PI) treated with one single dose of ibuprofen (IBU) and erythromycin (ERY)

Group	Otorrhea, %	No. ears with AOM (%)	No. of ME culture-positive samples (%)	Bacterial counts log ₁₀ CFU/20 µL, mean ± SD	% Body weight loss, mean ± SD
Untreated controls	95	90	100 *	3.42 ± 0.60	11.85 ± 3.57
IBU 2.5 mg/kg	100	100	95	3.17 ± 0.89	13.73 ± 3.60
IBU 7.5 mg/kg	100	100	100	3.65 ± 0.50	14.71 ± 1.26
ERY 5 mg/kg	65*	35*	65*	1.81 ± 1.35*	6.61 ± 4.87*
ERY 5 mg/kg + IBU 2.5 mg/kg	75*	40*	75*	1.87 ± 1.15*	6.01 ± 3.27*
ERY 5 mg/kg + IBU 7.5 mg/kg	70*	15*	70*	1.39 ± 0.93*	5.08 ± 2.81*

* Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of non-erythromycin-treated animals.**Table 4.** Outcome of AOM caused by *S. pneumoniae* treated in delayed form (18 h PI) with five doses of ibuprofen (IBU) and erythromycin (ERY)

Group	No. of ME culture-positive samples (%)	Bacterial counts log ₁₀ CFU/20 µL, mean ± SD	% Body weight loss, mean ± SD
Untreated controls	95	2.89 ± 0.94	11.67 ± 2.82
IBU 2.5 mg/kg	80	2.59 ± 1.25	10.13 ± 4.03
IBU 7.5 mg/kg	100	2.50 ± 0.91	8.67 ± 3.08
ERY 5 mg/kg	95	2.22 ± 0.58	8.23 ± 1.7†
ERY 5 mg/kg + IBU 2.5 mg/kg	80	1.65 ± 0.87*	8.18 ± 3.2†
ERY 5 mg/kg + IBU 7.5 mg/kg	75	1.80 ± 0.98*	5.60 ± 2.58‡

* Significant difference ($p \leq 0.05$) from non-erythromycin-treated animals.† Significant difference ($p \leq 0.05$) from values of untreated controls and low dose of ibuprofen alone.‡ Significant difference ($p \leq 0.05$) from all groups, except erythromycin plus low dose of ibuprofen.

the MEWF than animals not treated with antibiotic, but the difference was not statistically significant.

Table 3 presents the comparative findings of untreated control animals and the early treated animals with low- and high-dose ibuprofen alone and combined with erythromycin. Erythromycin therapy significantly improved all the parameters related with outcome *versus* the other comparative groups. Particularly, the regimen containing high-dose ibuprofen and erythromycin was more effective for most parameters tested than any other group, although the differences were not statistically significant. All antibiotic-treated animals had significantly lower amounts of polymorphonuclear leukocytes per

field in the MEWF (range, 2.06 ± 2.04 – 2.92 ± 3.41) than those of animals not treated with antibiotic (range, 4.46 ± 3.84 – 6.65 ± 4.62).

Table 4 presents the findings of untreated controls and delayed treatment animals receiving erythromycin and/or ibuprofen administered in five doses every 3 h starting at 18 h PI. Again, as therapy was initiated late, most animals (80–100%) had both otorrhea and AOM by otoscopic examination. Animals receiving erythromycin with or without ibuprofen showed lower bacterial counts in the ME fluid than the comparative groups, but the difference was only significant for those receiving the antibiotic along with ibuprofen. Also

animals receiving erythromycin had less weight loss than those not receiving the antibiotic. Furthermore, the percentage of weight loss of animals receiving erythromycin with the high-dose ibuprofen was significantly lower than that of animals receiving erythromycin alone. All antibiotic-treated animals had lower amounts of polymorphonuclear leukocytes per field in the MEWF than those of not treated with antibiotic, but again the differences were not statistically significant.

DISCUSSION

In the gerbil model of AOM, it is possible to induce a true bacterial infection as proved by otoscopic examination and the presence of polymorphonuclear leukocytes in the ME fluid. On the other hand, this model also allows the comparison of the bacteriologic efficacy of antibiotics, which, if they are effective, clear bacteria from the ME faster than spontaneous bacterial clearance in nontreated animals (6,10-13).

As the pneumococcal strain used was resistant to penicillin but susceptible to amoxicillin ($MIC = 1 \mu g/mL$), a single dose of this antibiotic administered at 5 h PI was moderately effective in the treatment of AOM in this model. This result may be explained by its favorable pharmacokinetics in both serum (10,11) and ME fluid (12) after an early administration of 5 mg/kg amoxicillin. The amoxicillin ME fluid concentration and half-life have been found to be less advantageous when administration of the antibiotic was delayed (12). These data can explain, in part, the better outcome achieved when the antibiotic was administered early compared to delayed despite giving five doses. These results are also consistent with previous data showing decreased amoxicillin effectiveness when administered 21 h PI compared to early administration (12). It is interesting to point out that most parameters of efficacy (presence of otorrhea, number of ME culture-positive samples, bacterial counts, and body weight) were more favorable in animals treated early with single doses of amoxicillin and ibuprofen, especially when the latter was used at high dose, although these differences were not statistically significant when compared to those receiving the antibiotic alone.

After the delayed treatment, bacterial counts were also lower in animals treated with amoxicillin combined with any dose of ibuprofen than in those treated with the antibiotic alone. Furthermore, animals receiving amoxicillin and high-dose ibuprofen showed the lowest weight loss, although no significant difference was achieved compared to those receiving the antibiotic alone. These results clearly favor the use of ibuprofen combined with amoxicillin, in early or delayed administration, in the treatment of experimental AOM caused by this pneumococcal strain.

Early and delayed therapy with erythromycin, with and without ibuprofen, was effective in this experimental model. We have previously shown a favorable pharmacokinetic profile in both serum and ME fluid after early administration of 5 mg/kg erythromycin. However, the half-life in the ME fluid is shorter with delayed administration, which correlates with the poorer outcome of AOM treated with delayed administration

of erythromycin, an observation also previously published (13). Animals treated with erythromycin and the high dose of ibuprofen, administered in early or delayed form, had lower bacterial counts in the ME fluid than those receiving the antibiotic alone, although the difference was not statistically significant. Regarding weight loss, animals treated with erythromycin and the high dose of ibuprofen lost less weight than those receiving the antibiotic alone, but the difference was statistically significant only for those receiving the treatment in delayed form. These results also favor the use of ibuprofen combined with erythromycin, in early or delayed administration, in the treatment of experimental AOM caused by this pneumococcal strain.

The benefit observed in animals treated with antibiotics combined with ibuprofen can be partly explained by the effect of ibuprofen in preventing animal deterioration, maintaining almost normal food and water intake, and hence, losing less body weight. This effect was statistically significant only for delayed administration of erythromycin, but it is possible that significant differences could be achieved if a greater number of animals had been used, but this was precluded by ethical reasons.

In animals treated with antibiotics and ibuprofen, there was also a tendency for a better bacteriological outcome, which may not be explained by a direct antimicrobial activity of ibuprofen against the organism ($MIC = 1024 \mu g/mL$) because ibuprofen serum concentration has been reported to be between 6 and 14 $\mu g/mL$ in gerbils receiving similar doses of this drug (14). Additionally, we did not demonstrate any antibacterial synergism to explain these results because we only found indifference between antibiotics and ibuprofen using a checkerboard method. The effect of anti-inflammatory drugs in the clinical efficacy of antibiotics has been debated in many infections, particularly in bacterial meningitis (15,16). If ibuprofen had a relevant anti-inflammatory effect in the ME, the antibiotic concentration would be diminished as its effectiveness. As it has been suggested that the effect of ibuprofen may be dose dependent with a proinflammatory effect at low dose (17), we tested two different (low and high) doses, and a clear trend for benefit was always observed. Ibuprofen increases leukocyte phagocytosis and degranulation (18), and such features may explain, at least in part, its positive effect in the bacteriological outcome when combined with active antibiotics. A randomized, double-blind, controlled trial of cefaclor plus ibuprofen, acetaminophen, or placebo in children with AOM showed the efficacy of ibuprofen for pain relief (2), but no bacteriological analysis was provided in such study.

In summary, ibuprofen seems to be useful combined with antibiotics for the treatment of an experimental pneumococcal AOM, an effect not observed using acetaminophen (6). Early therapy clearly correlated with improved effectiveness; therefore, if antibiotics are indicated, they should be administered, combined with ibuprofen, as early as possible. This therapeutic approach, which has been proposed by some authors (19,20), may lead to achieving maximal effectiveness and preventing serious complications (21).

Acknowledgment. We thank J. J. Granizo, Epidemiology and Preventive Medicine Unit, Fundación Jiménez Díaz-Capio for statistical advice.

REFERENCES

- McCaig LF, Hughes JM 1995 Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA* 273:214-219
- Bertin L, Pons G, d'Athis P, Duhamel JF, Maudelonde C, Lasfargues G, Guillot M, Marsac A, Debregeas B, Olive G 1996 A randomized, double-blind, multicentre controlled trial of ibuprofen versus acetaminophen and placebo for symptoms of acute otitis media in children. *Fundam Clin Pharmacol* 10:387-392
- American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis Media 2004 Diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* 113:1451-1465
- Graham GG, Scott KF 2005 Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther* 12:46-55
- Hersh EV, Lally ET, Moore PA 2005 Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* 21:1217-1226
- Ponte C, Parra A, Cenfor C, García-Olmos M, Giménez MJ, Aguilar L, Carcas A, Soriano F 2003 Does acetaminophen interfere in the antibiotic treatment of acute otitis media caused by a penicillin-resistant pneumococcus strain? A gerbil model. *Pediatr Res* 54:913-918
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999 Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Approved guideline. Document M26-A. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Eliopoulos G, Moellering R 1996 Antimicrobial combinations. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 330-396
- Cenfor C, Ponte C, Parra A, Nieto E, García-Calvo G, Gimenez MJ, Aguilar L, Soriano F 1998 In vivo efficacies of amoxicillin and cefuroxime against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a gerbil model of acute otitis media. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1361-1364
- Parra A, Ponte C, Cenfor C, García-Calvo G, Gimenez MJ, Aguilar L, Soriano F 2002 Optimal dose of amoxicillin in treatment of otitis media caused by a penicillin-resistant pneumococcus strain in the gerbil model. *Antimicrob Agents Chemother* 46:859-862
- Parra A, Ponte C, Cenfor C, Martínez-Marín C, Soriano F and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network 2004 Effect of antibiotic treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* strains with different susceptibilities to amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 48:860-866
- Martínez-Marín C, Huelves L, del Prado G, García-Cía JJ, Cenfor C, Ponte C, Granizo JJ, Soriano F 2005 Effect of erythromycin treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 56:783-786
- Jungkeit MC, Chole RA 1991 Ibuprofen inhibits localized bone resorption in the middle ear. *Calcif Tissue Int* 48:267-271
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ 2004 Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 39:1267-1284
- Tuomanen E, Hengstler B, Rich R, Bray MA, Zak O, Tomasz A 1987 Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the therapy for experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 155:985-990
- Rinaldo JE, Pennock B 1986 Effects of ibuprofen on endotoxin-induced alveolitis: biphasic dose response and dissociation between inflammation and hypoxemia. *Am J Med Sci* 291:29-38
- Nickerson SC, Paape MJ, Harmon RJ, Ziv G 1986 Mammary leukocyte response to drug therapy. *J Dairy Sci* 69:1733-1742
- Little P, Gould C, Williamson I, Moore M, Warner G, Dunleavy J 2001 Pragmatic randomised controlled trial of two prescribing strategies for childhood acute otitis media. *BMJ* 322:336-342
- Handley JO 2002 Otitis media. *N Engl J Med* 347:1169-1174
- Van Zuijlen DA, Schilder AG, Van Balen FA, Hoes AW 2001 National differences in incidence of acute mastoiditis: relationship to prescribing patterns of antibiotics for acute otitis media? *Pediatr Infect Dis J* 20:140-144

Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates, effect of serum on adhesion, and virulence in the gerbil otitis media model

Lorena Huelves^a, Gema del Prado^a, Violeta Rodriguez-Cerrato^a, Matilde Gracia^a,
Carlos Cenjor^b, Juan J. Granizo^c, Carmen Ponte^a, Francisco Soriano^{a,*}

^aDepartments of Medical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain

^bDepartment of Otolaryngology, Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain

^cDepartment of Epidemiology, Fundación Jiménez Díaz, Avenida de Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Received 16 March 2007; accepted 14 May 2007

Available online 18 May 2007

Abstract

The adherence of 11 pneumococcal strains to polystyrene was studied and expressed as the number of colony-forming units (CFU) recovered per 10^6 CFU of initial inoculum. Three strains were considered as strong adherent (> 100 CFU/ 10^6), three as medium adherent (10 – 100 CFU/ 10^6), and five as low adherent (< 10 CFU/ 10^6). All serotype 3 strains were low adherent whilst serotypes 23F and 19F behaved as strong or medium adherent. The impact of gerbil sera on adherence of six selected pneumococcal strains (one strong adherent, one medium adherent, and four low adherents) to abiotic material was also studied under two experimental conditions. In the presence of sera, the adherence ability of the strong, medium, and one low adherent strains decreased significantly. On the other hand, the adherence significantly increased in all strains when sera were removed following preincubation of bacteria exposed to sera, although such increase was statistically significant for five of them. Finally, the ability of two (one strong adherent and one low adherent) strains to induce otitis media in gerbils was also evaluated; the strong adherent strain behaved significantly more virulent than the less adherent in terms of ear damage and animal weight loss.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pneumococcus; Adherence; Serum; Virulence; Otitis

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae is a common colonizer of the upper respiratory tract in humans and a leading cause of acute otitis media, community-acquired pneumonia, bacteremia, and bacterial meningitis [1,2]. Bacterial adherence allows the organism to bind to eukaryotic cells and inert material; thus in this regard, it is the first step for pathogenicity. Bacterial adhesion to inert material is probably mediated by physicochemical interaction, wherein many factors are involved, including cell envelope plasticity of bacteria, the target substratum properties, and environmental features [3,4]. Once bacterial cells bind successfully to the surface, accretion of bacteria can ensue

with bacterial cluster formation and further biofilm development [5].

The adherence of *S. pneumoniae* to clinically used abiotic surfaces has not been extensively studied, but pneumococcal binding to these surfaces (i.e., tympanostomy tubes and cochlear implants) may cause clinical problems [6].

It is well known that some pneumococcal strains may form biofilms in vitro [6–9], but to the best of our knowledge, such ability has not been clearly demonstrated in an animal infection model.

The aims of this study were to determine the binding properties of different pneumococcal strains to polystyrene plates, to correlate such adhesion pattern with microbial characteristics, to study the effect of gerbil sera on the adherence phenomenon, and to compare the virulence of two strains, one strongly adherent and one weakly adherent, using the gerbil model of otitis media.

*Corresponding author. Tel.: +34 91 544 73 87; fax: +34 91 549 47 64.
E-mail address: fsoriano@fjd.es (F. Soriano).

2. Results

2.1. Adherence to microtiter plates

Table 1 presents the results of the adherence studies arranged from the highest to the lowest ability. The adherence rate varied from 685.5 ± 192.7 to <0.3 CFU (colony forming unit) adhered per 10^6 CFU. There was no relationship between adherence ability, strain source, and susceptibility to antibiotics. Three serotype 23F strains were studied, two of them showing strong adherence and one medium adherence. Among the two strains each of serotypes 6B and 9V one was medium adherent while the other was low adherent. The three serotype 3 strains were low adherent whilst the sole serotype 19F studied was strongly adherent. Fig. 1 shows the mean adherence values of the strong adherent, medium adherent, and low adherent strains with statistically significant difference values among them ($p < 0.001$, Mann–Whitney test).

2.2. Effect of serum on adherence ability

No bactericidal effect was observed when bacterial strains were exposed to gerbil sera. The adherence properties of six selected pneumococcal strains under different experimental conditions are presented in Table 2. When the three most adherent pneumococcal strains (all non-serotype 3) were incubated with gerbil sera without further washing for removing sera, the adherence ability decreased dramatically (more than 20 times). The difference in adherence among broth-treated and serum-treated organisms was statistically significant ($p < 0.0001$). However, opposite results were obtained when serum was removed by two washings with saline after previous incubation of bacteria and sera. For the above-mentioned strains, the adherence increased by 2–6 times the difference being statistically significant for two of them. For serotype 3 strains, that were all low adherent, no significant differ-

ences were found in presence of gerbil serum but, when serum was removed, their ability to adhere to polystyrene increased greatly (65–120 times) with statistically significant differences between broth-treated and serum-treated organisms ($p < 0.0001$).

2.3. Bacterial virulence in the otitis media model in gerbils

Table 3 summarizes the evaluated parameters in animals inoculated with $5.42 \pm 0.17 \log_{10}$ CFU of the strong adherent, and $5.38 \pm 0.10 \log_{10}$ CFU of the low adherent strains. The most adherent strain was significantly more virulent than the low adherent one for all evaluated parameters: presence of otorrhea, acute otitis media by

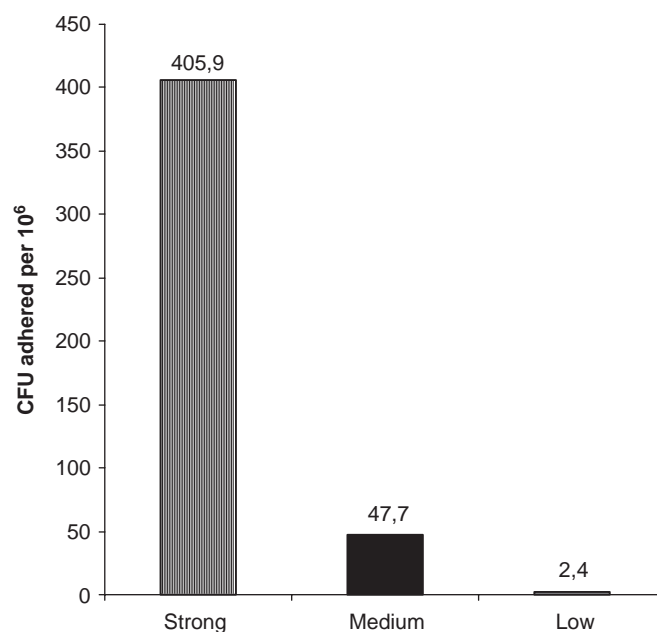


Fig. 1. Mean adherence values (CFU adhered/ 10^6) to polystyrene plates of strong, medium, and low adherent pneumococcal strains.

Table 1
Bacterial strains, microbiological characteristics, and adherence to polystyrene plates

Strain		MIC (mg/L)			Adherence	
Reference (serotype)	Source	Penicillin	Erythromycin	Levofloxacin	CFU adhered ^a	Category
FJD60 (23F)	Blood	2	0.12	0.5	685.5 ± 192.7	Strong
MJD573 (23F)	csf ^b	4	0.12	1	398.6 ± 81.7	Strong
ATCC49619 (19F)	Sputum	0.5	0.12	1	133.6 ± 49.7	Strong
MJD1225 (6B)	Blood	4	0.12	1	80.5 ± 48.9	Medium
AR06016 (9V)	Respiratory tract	4	0.12	1	39.1 ± 21.5	Medium
AR30118 (23F)	Respiratory tract	≤ 0.03	0.12	1	23.6 ± 9.4	Medium
MJD3032 (6B)	Blood	2	> 128	0.5	7.9 ± 3.7	Low
AR09164 (9V)	Respiratory tract	4	0.12	1	2.6 ± 2.9	Low
AR33118 (3)	Respiratory tract	≤ 0.03	0.12	1	0.66 ± 0.69	Low
FL2812 (3)	Blood	≤ 0.03	0.12	4	0.65 ± 0.45	Low
FL5629 (3)	Blood	≤ 0.03	0.12	32	< 0.3	Low

^aPer 10^6 CFU inoculum.

^bCerebrospinal fluid.

Table 2

Adherence to polystyrene plates of six pneumococcal strains: effect of serum in two different experimental conditions

Strain (serotype)	CFU adhered per10 ⁶ CFU inoculum (mean±SD)			
	Without wash		With wash	
	Broth ^a	Serum	Broth ^a	Serum
FJD60 (23F)	471.1±235.6	14.3±10.8 ^b	412.1±289.1	2542.0±1690.2 ^b
MJD1225 (6B)	92.9±90.2	1.9±2.0 ^b	71.2±25.7	368.1±264.6 ^b
MJD3032 (6B)	12.4±7.5	<0.6 ^b	8.6±3.7	16.9±15.1
AR33118 (3)	0.9±0.5	1.3±0.4	1.9±1.1	123.0±52.5 ^b
FL2812 (3)	1.5±1.3	1.3±1.0	2.8±1.0	271.1±110.0 ^b
FL5629 (3)	0.7±0.3	1.1±0.7	1.0±1.0	119.4±34.2 ^b

^aCA-MHB.

^bDifferences between broth and serum treated were statistically significant ($p < 0.0001$).

Table 3

Outcome results of experimental otitis media induced by a strongly adherent (FJD60) and a low adherent (AR09164) pneumococcal strain to polystyrene plates

Evaluated parameter	Strain FJD60	Strain AR09164	<i>p</i> -value
Otorrhea (%)	96.9	62.5	<0.001
Acute otitis media (%)	90.6	28.1	<0.001
ME culture-positive samples (%)	81.2	53.1	0.017
Bacterial count (mean log ₁₀ CFU/ 20 µL±SD)	2.20±1.02	1.56±1.06	0.018
Polymorphonuclear cells count (mean±SD)	3.27±1.68	2.07±1.16	0.044
% of body weight loss (mean±SD)	9.18±3.51	4.07±4.27	0.001

otoscopic examination, ME culture-positive samples, bacterial and polymorphonuclear cells load in ME, and weight loss ($p < 0.05$).

3. Discussion

Adhesion of *S. pneumoniae* to target animal cells has been extensively studied, but pneumococcal adhesion to inert surfaces is only recently under deep investigation [7–10]. Adherence to abiotic material may contribute essentially to the persistence of pneumococci in certain human infections, such as otitis media associated to tympanostomy tubes or meningitis in cochlear implant recipients [11–18]. Our study has shown a variety of adhesive properties to polystyrene plates by 11 *S. pneumoniae* clinical isolates from strongly adherent to low adherent behavior. The ability to adhere to polystyrene was not related to bacterial source or susceptibility to antibiotics. Regarding pneumococcal serotypes, the adherence results varied, although all serotype 3 strains were low adherent, whilst among four strains of serotypes 19F and 23F, three showed strong and one medium adherence ability.

Pneumococcal adherence to polystyrene plates in bacteria exposed to gerbil serum was method-dependent. In the presence of gerbil serum, the three most adherent strains significantly diminished such ability. The inhibitory effects of several plasma proteins on bacterial adhesion to any surface have been described [19,20]. In particular, albumin exerts one of the strongest inhibitory effect [3,21] which may be due to the fact that it is an acidic protein raising the surface net negative charge [22,23] and increasing the repulsion between electric double layers adjacent to the organism and the polystyrene plate. Furthermore, the capacity of some components of sera to diminish such ability could be used to prevent or to delay pneumococcal colonization of inert surfaces. In fact, a reduction of adherence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to titanium surfaces coated with human serum albumin has been shown [24], and both organisms have been frequently involved in otitis media associated to tympanostomy tubes [25]. We observed the contrary effect (an increase in pneumococcal adhesion) when after preincubation of the organism with gerbil serum, serum was removed, and next bacteria were exposed to polystyrene plates. These results have not been previously reported and suggest a significant change on bacterial cell surface creating a net positive charge, which, probably together with van der Waals attraction, would decrease the distance between the surface of the bacterium and the substrata and facilitate adherence [23]. Our results show that the ability of pneumococcal strains to adhere to inert material may vary and this could be important in foreign body associated infections.

Pneumococcal adherence to epithelial cells is a prerequisite for colonization and disease [26,27]. The pathogen–host interactions may be mediated by the binding of pneumococcal surface-exposed adhesins to specific cellular receptor molecules [9,28]. In certain infections, host cell-adhered organisms can produce a biofilm, which may contribute to persistent infections. In this sense, we have previously suggested that in some experimental otitis media models bacterial adherence or biofilm formation could contribute to antibiotic failure [29,30].

Although no relationship between pneumococcal adherence to polystyrene and virulence has been established, we selected two strains, one strong adherent and another low adherent, to compare their ability for inducing acute otitis media in gerbils. Our results clearly show that the polystyrene-strong adherent strain was capable to induce a more severe otitis than that induced by the low adherent strain, as shown by all evaluated parameters. These findings support the hypothesis that the process of bacterial adhesion to epithelial cells may include a two-step process with an initial physicochemical interaction phase, similar to that shown on inert material, followed by a late molecular and cellular interaction phase. Both phases may induce in the host non-immunologic and immunologic responses of varied severity. Nevertheless, before definitive conclusions may be drawn, more virulence studies, using the otitis

media model, should be made including strains of different serotypes and adherence ability. Recently, much has been learned about the molecular aspects of bacteria–substratum interactions [9,31,32], but bacterial adhesion molecular and cellular events have not been elucidated yet despite significant advances with clinical implications [33].

In conclusion, we found that all pneumococcal strains of serotypes 23F and 19F behaved as strong or medium adherent to polystyrene plates whilst serotype 3 strains showed low adherence ability. The adherence of non-serotype 3 pneumococcal strains to polystyrene was significantly reduced in presence of gerbil sera. In all strains, an increased adhesion was observed when the serum was removed after preincubating the organism with sera, which means that it was possible to convert the three serotype 3 strains from low to strong adherence behavior following this latter treatment. Finally, a strong adherent pneumococcal strain induced a more severe otitis media in the gerbil model compared to that observed with a non-adherent strain. These preliminary observations, which should be spanned to include more pneumococcal strains, can contribute to a better understanding of pneumococcal pathogenicity as well as to preventing bacterial adherence not only to inert material but also to epithelial cells. Future research is warrant on the molecular and structural characterization of pneumococcal cell envelope components that may act as adhesins, and on strategies to limit adherence and/or biofilm formation in experimental *S. pneumoniae* infection systems, particularly in animal models.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial strains

All the strains used in this study are listed in Table 1. These strains were chosen based on the pneumococcal serotypes commonly involved in human acute otitis media and have different antimicrobial susceptibility patterns.

4.2. Adherence to polystyrene (microtiter) plates

Isolated colonies from blood agar plates incubated for 20 h at 35 °C in a 5% CO₂ atmosphere were used to prepare inocula. A bacterial suspension was prepared in preheated cation-adjusted Mueller Hinton broth (CA-MHB, Becton Dickinson, Co., Sparks, MD), adjusted to an optical density equivalent to 10⁸ CFU/mL, and 200 µL per well of such inoculum were transferred to flat-bottom polystyrene, non-tissue-culture-treated 96-well microtiter plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany). After 2 h incubation at 35 °C in air, the liquid was removed from the wells, and the wells were gently washed 10 times with saline. After the last washing, wells were scraped thoroughly with particular attention to well edges. Material removed was resuspended in 200 µL of CA-MHB, diluted and plated on blood agar plates for colony counting. The

adherence rate for each strain was arbitrarily expressed as CFU recovered per 10⁶ CFU of initial inoculum. All experiments were done 3 times by duplicate, and mean ± SD was calculated. The ability of bacterial strains to adhere to microtiter plates was arbitrarily categorized as strong adherent (>100 CFU/10⁶), medium adherent (10–100 CFU/10⁶), and low adherent (<10 CFU/10⁶).

4.3. Effect of serum on adherence ability

The effect of gerbil serum on the adherence to polystyrene plates was studied in six selected pneumococcal strains (one strong adherent, one medium adherent, and four low adherents) following two methodological approaches. In both methods, a bacterial suspension of approximately 10⁹ CFU/mL in CA-MHB was prepared and was further diluted 1/10 in gerbil serum (final inoculum of approximately 10⁸ CFU/mL), and incubated 30 min at 35 °C in air. In the first set of experiments, 100 µL of this mixture was dispensed in microtiter wells. In the second experiments, after the 30 min incubation period, the serum was removed making two washes with saline, followed by resuspension of the cells in CA-MHB, and dispensing 100 µL per well in microtiter plates. For both experimental conditions, the microtiter plates were incubated 2 h at 35 °C in air and processed as previously described in the above paragraph. Each experiment was done in parallel using bacteria exposed to serum and broth (CA-MHB) alone. All the studies were done 5 times by duplicate and mean ± SD was calculated.

The measurement of growth rate in all media was used to prevent any artifactual effect due to a possible bactericidal effect of serum.

4.4. Gerbil model of pneumococcal otitis media

Meriones unguiculatus weighing 49 ± 5 were used in all experiments, which were approved by and conducted in accordance with prevailing regulations regarding the care and use of laboratory animals in the European Community and approved by the Review Board for Animal Experimentation of Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. The experimental study was carried out following previously described procedure [30] using 16 animals per bacterial strain tested. Briefly, animals were inoculated bilaterally with approximately 3 × 10⁵ CFU of the pneumococcal strain per 20 µL, which were introduced directly in the middle ear (ME) bulla. Two different pneumococcal strains were tested, one previously determined as being strong (FJD60), and other low adherent (AR09164). The tympanic membrane was left intact and swelled without rupture during the inoculation. A normal tympanic aspect and correct inoculation were verified using an operating microscope. Twenty-four hours after inoculation, the presence of otorrhea was noted and the next day an otoscopic examination was performed and the animals weighted. Acute otitis media was defined as otorrhea

through a perforation in the tympanic membrane and/or inflammatory signs with changes in the membrane's normal yellowish-pink appearance to a gray, dark brownish-yellow or whitish opaque area, with a very rough surface texture. At the same time of otoscopic examination, ME samples were obtained by washing the ME fossa with 20 μ L of saline solution injected and withdrawn via the epitympanic membrane with a 0.33-mm needle. Aliquots of serial 10-fold dilutions in saline were plated on sheep blood agar and incubated for 24 h at 35 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Bacterial counts are expressed as log₁₀ CFU/20 μ L; the lowest detectable bacterial count was 4 CFU/20 μ L (0.60 log₁₀ CFU/20 μ L). To evaluate the presence of polymorphonuclear (PMN) leukocytes, 3 μ L of ME washing fluid was extended over a 6-cm² slide surface for Gram staining and observed under a high-power (magnification, 1000 \times) microscope.

4.5. Statistical analysis

Differences in adherence ability to polystyrene plates were analyzed by the Mann–Whitney test. To compare the presence of otorrhea, otoscopic appearance, and ME culture-positive samples the Fisher's exact or Chi-square test were used. The *t*-test or Mann–Whitney test was used to compare the reduction of log₁₀ CFU, data for culture-negative samples were included in the calculation of means by assuming a value at the detection limit (0.60 log₁₀ CFU). The Mann–Whitney test was used to compare PMN counts and loss of body weight. A *p*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments

This work was supported by a grant (PI30578) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Ministry of Health and Consume, Spain. L.H. and G.d.P. were aided with scholarships from the Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, Madrid, and M.G. with a scholarship from the FIS, Spain.

References

- [1] Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 1986;18(Suppl. A):35–45.
- [2] Cartwright K. Pneumococcal disease in Western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr* 2002;161:188–95.
- [3] An YH, Friedman TJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1998;43:338–48.
- [4] Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006;188:3572–81.
- [5] Braxton E, Ehrlich E. Jr. GD, Hall-Stoodley L, Stoodley P, Veeh R, Fux C, et al. Role of biofilms in neurosurgical device-related infections. *Neurosurg Rev* 2005;28:249–55.
- [6] Allegrucci M, Hu FZ, Shen K, Hayes J, Ehrlich GD, Post JC, et al. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J Bacteriol* 2006;188:2325–35.
- [7] Budhani RK, Struthers JK. The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:601–2.
- [8] Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sani L, Murga R, Edmonds P, et al. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4980–8.
- [9] Moscoso M, García E, López R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* 2006;188:7785–95.
- [10] Stoor P, Soderling E, Grenman R. Bioactive glass S53P4 in repair of septal perforations and its interaction with the respiratory infection-associated microorganisms *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Biomed Mater Res* 2001;58:113–20.
- [11] Ah-Tye C, Paradise JL, Colborn DK. Otorrhea in young children after tympanostomy-tube placement for persistent middle-ear effusion: prevalence, incidence, and duration. *Pediatrics* 2001;107:1251–8.
- [12] Cunningham III CD, Slattery III WH, Luxford WM. Postoperative infection in cochlear implant patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:109–14.
- [13] Gates GA, Avery C, Prihoda TJ, Holt GR. Delayed onset post-tympanostomy otorrhea. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;98:111–5.
- [14] Green KM, Bhatt YM, Saeed SR, Ramsden RT. Complications following adult cochlear implantation: experience in Manchester. *J Laryngol Otol* 2004;118:417–20.
- [15] Kay D J, Nelson M, Rosenfeld RM. Meta-analysis of tympanostomy tube sequelae. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:374–80.
- [16] Mandel EM, Casselbrant ML, Kurs-Lasky M. Acute otorrhea: bacteriology of a common complication of tympanostomy tubes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:713–8.
- [17] Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:2083–94.
- [18] Reefhuis J, Honein MA, Whitney CG, et al. Risk of bacterial meningitis in children with cochlear implants. *N Engl J Med* 2003;349:435–45.
- [19] Bridgett MJ, Davies MC, Denyer SP. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surface by polymer surface modification with surfactants. *Biomaterials* 1992;13:411–6.
- [20] Paulsson M, Kober M, Freij-Larsson C, Stollenwerk M, Wesslen B, Ljungh A. Adhesion of staphylococci to chemically modified and native polymers, and the influence of preadsorbed fibronectin, vitronectin and fibrinogen. *Biomaterials* 1993;14:845–53.
- [21] McDowell SG, An YH, Draughn RA, Friedman RJ. Application of a fluorescent redox dye for enumeration of metabolically active bacteria on albumin-coated titanium surfaces. *Lett Appl Microbiol* 1995;21:1–4.
- [22] Brokke P, Dankert J, Carballo J, Feijen J. Adherence of coagulase-negative staphylococci onto polyethylene catheters in vitro and in vivo: a study on the influence of various plasma proteins. *J Biomater Appl* 1991;5:204–26.
- [23] Reynolds EC, Wong A. Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and *Streptococcus mutans* adherence. *Infect Immun* 1983;39:1285–90.
- [24] Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Könönen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol* 2005;26:380–4.
- [25] Roland PS, Pary DA, Stroman DW. Microbiology of acute otitis media with tympanostomy tubes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133:585–95.
- [26] Barthelson R, Mobasser A, Zopf D, Simon P. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect Immun* 1998;66:1439–44.
- [27] Romero-Steiner S, Pilishvili T, Sampson JS, Johnson SE, Stinson A, Carlone GM, et al. Inhibition of pneumococcal adherence to human

- nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:246–51.
- [28] Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature 1995;377:435–8.
- [29] Martínez-Marín C, Huelves L, Del Prado G, García-Cía JJ, Cenjor C, Ponte C, et al. Effect of erythromycin treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2005;56:783–6.
- [30] Parra A, Ponte C, Cenjor C, Martínez-Marín C, Soriano F. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Effect of antibiotic treatment delay on therapeutic outcome of experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* strains with different susceptibilities to amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:860–6.
- [31] Matsumoto-Nakano M, Kuramitsu HK. The role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2006;188:8095–102.
- [32] Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:12558–63.
- [33] Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. JAMA 2006;296:202–11.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAP & AAFP.- American Academy of Pediatrics and American Academy of Family Physicians, Academia Americana de Pediatría y Academia Americana de Médicos de Familia
ABC.- Área Bajo la Curva
B.- Capacidad de formación de biopelícula
IgA.- Inmunoglobulina A
IgG.- Inmunoglobulina G
IgM.- Inmunoglobulina M
iv.- intravenosa
Im.- muscular
IL.- Interleucina
CAT.- Catalasa
CBPs.- Choline Binding Proteins, proteínas de unión a colina
CDCs.- Citolisinas dependientes de colesterol
CL.- Aclaramiento del fármaco
C_{max}.- Concentración máxima
CMB.- Concentración Mínima Bactericida
CMI.- Concentración Mínima Inhibitoria
COX.- Ciclooxigenasa
CRP.- C Reactive Protein, proteína C reactiva
CSS.- Concentraciones plasmáticas en estado estacionario
Cw.- Control sin bacteria
D.O.- Densidad Óptica
F.- Biodisponibilidad
FDA.- Food and Drug Administration
FIC.- Fractional Inhibitory Concentration, concentración fraccional inhibitoria
GSH Px.- Glutathion peroxidasa
LTAs.- Lipoteicoicid Acids, ácidos lipoteicoicos
MDA.- Malonildialdehído
MHB II.- Mueller-Hinton Broth II, caldo Mueller- Hinton II
Nan.- Neuraminidasa
NMR.- Neumococos Multi-Resistentes
NO.- Óxido nitroso
OM.- Otitis media
OMA.- Otitis media aguda
OMC.-Otitis media crónica
OMD.- Otitis media con derrame
OMI.- Otitis media intermedia
or.- oral
PAMPs.- Patrones moleculares asociados a patógenos
PBP.- Penicillin Binding Proteins, proteínas de unión a penicilina
PBS.- Phosphate Saline Buffer, tampón fosfato
PCR.- Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PD.- Pharmacodinamy, farmacodinamia
p.i.- post-inoculación
PK.- Pharmacokinetics, farmacocinética
PMNs.- Células polimorfonucleares
Ply.- Pneumolysin, neumolisina
Pot D. - Proteína transportadora poliamina D
PsaA.- Pneumococcal surface antigen A, antígeno de superficie neumocócica
PspC.- Pneumococcal surface protein C, proteína de superficie C
PSPC.- Polisacárido de la Pared Celular